

Aus der AG Molekulare Onkologie und Immuntherapie
Abteilung für Allgemeine, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. Ernst Klar

Wirkungen von avitalen *S. pyogenes*, Trastuzumab und Panitumumab auf humane Pankreas- und Kolonkarzinomzellen

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Tilly Ritz, geb. am 18.09.1985 in Berlin
aus Rostock

Rostock, 21.01.2014

Dekan: Prof. Dr. med. E. C. Reisinger
1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Michael Linnebacher
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Robert Jaster
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Matthias Löhr

Datum der Verteidigung: 10. Dezember 2014

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
TABELLENVERZEICHNIS	XI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das kolorektale Karzinom (KRK)	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Ätiologie	1
1.1.3 Pathogenese	1
1.1.4 Hereditäre Formen des KRK	3
1.1.5 KRK und chronisch entzündliche Darmerkrankungen.....	3
1.1.6 Klinische Symptomatik	3
1.1.7 Diagnostik.....	4
1.1.8 Therapiekonzepte.....	5
1.2 Das Pankreaskarzinom	7
1.2.1 Epidemiologie.....	7
1.2.2 Ätiologie	7
1.2.3 Pathogenese und Morphologie	8
1.2.4 Klinische Symptomatik	10
1.2.5 Diagnostik.....	11
1.2.6 Therapiekonzepte.....	11
1.3 <i>Streptococcus pyogenes</i>	13
1.4 Bakterielle Immuntherapie	15
1.4.1 Eigene Untersuchungen der Arbeitsgruppe	17
1.4.2 Kombinationstherapie – Konjugation von <i>S. pyogenes</i> mit mAk.....	18
2 ZIELSTELLUNG	19

3.2.2.9 Zellzyklusanalyse und Apoptosenachweis mittels SubG1-Peak Analyse	32
3.2.2.10 Kokulturuntersuchungen	33
3.2.2.10.1 MLC (<i>mixed lymphocyte culture</i> , gemischte Lymphozytenkultur).....	33
3.2.3 Molekularbiologische Methoden	33
3.2.3.1 RNA-Isolierung aus Tumorzellen	33
3.2.3.2 Prüfen der RNA-Länge mittels Agarosegelelektrophorese	34
3.2.3.3 cDNA Synthese	34
3.2.3.4 Quantitative <i>RealTime</i> -PCR mittels TaqMan.....	34
3.3 Statistik	36
4 ERGEBNISSE	37
4.1 Rezeptorexpression der Tumorzellen	37
4.2 Internalisierung avitaler <i>S. pyogenes</i> in Zielzellen	38
4.2.1 Bakterielle Inaktivierung durch Druck	38
4.2.2 Bakterielle Inaktivierung durch Ethanol.....	39
4.3 WST-1 Assay	41
4.3.1 Bakterielle Inaktivierung durch Druck	41
4.3.2 Bakterielle Inaktivierung durch Ethanol.....	43
4.4 Calcein-AM Vitalitätsassay.....	46
4.4.1 Bakterielle Inaktivierung durch Druck	46
4.4.2 Bakterielle Inaktivierung durch Ethanol.....	48
4.5 Zellzyklusanalyse	52
4.6 Apoptosenachweis.....	54
4.7 RNA Analyse	55
4.8 Quantifizierung der Tumorzellen nach Kokultur in der gemischten Lymphozytenkultur	55
5 DISKUSSION.....	59
5.1 Immuntherapie gastrointestinaler Karzinome	59
5.2 Vergleich der eigenen Ergebnisse mit der Literatur.....	63

5.2.1	Bakterien und Inaktivierungsvarianten.....	63
5.2.2	Invasionsverhalten	64
5.2.3	mAk-Monotherapie.....	64
5.2.3.1	Einfluss der EGFR- & HER2/neu-Expression auf das Therapieansprechen.....	64
5.2.3.2	Mutationsstatus der Zelllinien und Therapieansprechen.....	66
5.2.4	Bakterielle Monotherapie mit avitalen Streptokokken	68
5.2.5	Kokulturuntersuchungen in Anwesenheit von Immunzellen	71
5.2.5.1	mAk-Monotherapie	71
5.2.5.2	Bakterielle Monotherapie	72
5.2.6	Kombinationstherapie.....	73
5.3	Zusammenfassender Vergleich der Therapieschemata	74
6	ZUSAMMENFASSUNG	76
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	XII
A	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	XXIX
B	DANKSAGUNG	XXX
THESEN	XXXI

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADCC	antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (<i>antibody-dependent cell mediated cytotoxicity</i>)
APC	Adenomatöse Polyposis coli (<i>adenomatous poliposis coli</i>)
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester
CD	Differenzierungsgruppe (<i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CFDA-SE	Carboxyfluorescein diacetate Succinimidylester
cfu	kolonieformende Einheit (<i>colony forming unit</i>)
CT	Computertomographie
DCC	im kolorektalem Karzinom gelöscht (<i>deleted in colorectal cancer</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
<i>DPC4</i>	im Pankreaskarzinom gelöscht (<i>deleted in pancreatic cancer</i>) (Genlokus 4)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
EI	Ethanolinaktivierung
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
Fab	antigenbindende Region eines Antikörpers (<i>fragment antigen binding</i>)
FACS	fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
Fc	auskristallisierendes Fragment eines Antikörpers (<i>fragment crystallizable</i>)
FKS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (<i>gravitation</i>)
h	Stunden
HDI	Hochdruckinaktivierung
Her-2/neu	<i>human epithelial receptor 2/neurological</i>
Ig	Immunglobulin

IPMN	intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie (<i>intraductal papillary mucinous neoplasm</i>)
<i>KRAS</i>	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene</i>
LSM	Lymphozytenseparationsmedium (<i>lymphocyte separation medium</i>)
LTA	Lipoteichonsäure (<i>Lipoteichoic acid</i>)
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	Hauptgewebeverträglichkeitskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MLC	gemischte Lymphozytenkultur (<i>mixed lymphocyte culture</i>)
MRT	Magnetresonanztomographie
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OD	optische Dichte
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasie (<i>pancreatic intraepithelial neoplasia</i>)
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PI	Propidiumiodid
RAF	<i>rapidly growing fibrosarcoma</i> oder <i>rat fibrosarcoma</i>
RT-PCR	Echtzeit-PCR (<i>RealTime-PCR</i>)
SLO	Streptolysin O
SLS	Streptolysin S
S-Phase	Synthesephase
TGFβ	transformierender Wachstumsfaktor β (<i>transforming growth factor β</i>)
TNM	Klassifikationssystem maligner Tumoren, Tumor (Lymph-)Knoten Metastase (<i>Tumor Nodes Metastasis</i>)
<i>TP53</i>	Tumorsuppressorgen 53
UICC	Internationale Vereinigung gegen Krebs (<i>Union internationale contre le cancer</i>)
WST-1	wasserlösliches Tetrazolium (<i>water soluble tetrazolium</i>)
<i>wt</i>	Wildtyp (<i>wild type</i>)

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Schematische Darstellung der Wirkung von mAk auf den EGF-Rezeptor. MAk (hier: Panitumumab) besetzen die Ligandenbindungsstellen der überexprimierten Rezeptoren und verhindern so eine effiziente Signaltransduktion. Im Ergebnis werden antiapoptotische, proliferative und angiogenetische Effekte unterdrückt. (Dietel M *et al.*, 2008)..... 6
- Abb. 2: Schematische Darstellung der PanIN Läsionen und deren wichtigsten molekularpathologisch nachweisbaren Mutationen. (modifiziert nach: Klein WM *et al.*, 2002) 10
- Abb. 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme (Vergrößerung 5000fach) der Bindung von inaktivierten *S. pyogenes* an Pankreaskarzinomzellen der Linie MIA PaCa-2. (Eigene Darstellung) 14
- Abb. 4: Schematische Darstellung der bakterienvermittelten Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen. (Maletzki C, 2009, unveröffentlichte Daten) 16
- Abb. 5: Schematische Darstellung der Kopplung der mAk über den Fc-Teil an das Protein A der Streptokokken. Mithilfe der Fab-Fragmente wird die Bindung an den EGFR bzw. Her2/neu auf der Tumorzelloberfläche vermittelt. (Eigene Darstellung)..... 18
- Abb. 6: Darstellung der EGFR und Her-2/neu Expression auf Pankreaskarzinomzellen. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. 37
- Abb. 7: Darstellung der EGFR und Her-2/neu Expression auf Kolonkarzinomzellen. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. 38
- Abb. 8: Darstellung des Anteils an Pankreaskarzinomzellen mit intrazellulären HDI bzw. EI-*S. pyogenes* nach zwei und 24 h Inkubation. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$ (Werte normalverteilt); # $p < 0,05$ (Werte nicht normalverteilt). 40
- Abb. 9: Darstellung des Anteils an KRK-Zellen mit intrazellulären HDI bzw. EI *S. pyogenes* nach zwei und 24 h Inkubation. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$ (Werte normalverteilt). 41

- Abb. 10: Darstellung der metabolischen Aktivität der Pankreaskarzinomzelllinie MIA PaCa-2 nach 24 und 48 h Behandlung mit HDI *S. pyogenes* in Relation zur Kontrolle. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt und bei der Auswertung zu 100 % gesetzt. Die Zellen wurden sowohl mit *S. pyogenes* und den mAk, als auch mit beiden Kombinationen (Bakterien + mAk) koinkubiert. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. #p<0,05 (Werte nicht normalverteilt). 42
- Abb. 11: Darstellung der metabolischen Aktivität der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 nach 24 und 48 h Behandlung mit HDI *S. pyogenes* in Relation zur Kontrolle. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt und bei der Auswertung zu 100 % gesetzt. Die Zellen wurden sowohl mit *S. pyogenes* und den mAk, als auch mit beiden Kombinationen (Bakterien + mAk) koinkubiert. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. *p<0,05 (Werte normalverteilt); #p<0,05 (Werte nicht normalverteilt). 43
- Abb. 12: Darstellung der metabolischen Aktivität der Pankreaskarzinomzelllinie MIA PaCa-2 nach 24, 48 und 72 h Behandlung mit EI *S. pyogenes* in Relation zur Kontrolle. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt und bei der Auswertung zu 100 % gesetzt. Die Zellen wurden sowohl mit *S. pyogenes* und den mAk, als auch mit beiden Kombinationen (Bakterien + mAk) koinkubiert. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. *p<0,05 (Werte normalverteilt); #p<0,05 (Werte nicht normalverteilt). 44
- Abb. 13: Darstellung der metabolischen Aktivität der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 nach 24, 48 und 72 h Behandlung mit EI *S. pyogenes* in Relation zur Kontrolle. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt und bei der Auswertung zu 100 % gesetzt. Die Zellen wurden sowohl mit *S. pyogenes* und den mAk, als auch mit beiden Kombinationen (Bakterien + mAk) koinkubiert. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. *p<0,05 (Werte normalverteilt); #p<0,05 (Werte nicht normalverteilt). 45
- Abb. 14: Darstellung des Anteils vitaler Pankreaskarzinomzellen der Zelllinie MIA PaCa-2 nach 24 und 48 h Behandlung mit HDI *S. pyogenes* in Relation zur Kontrolle. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt und bei der Auswertung zu 100 % gesetzt. Die Zellen wurden sowohl mit *S. pyogenes* und den mAk, als auch mit beiden Kombinationen (Bakterien + mAk) koinkubiert. Gezeigt werden die

- jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. #p<0,05 (Werte nicht normalverteilt). 47
- Abb. 15: Darstellung des Anteils vitaler Kolonkarzinomzellen der Zelllinie HROC60 nach 24 und 48 h Behandlung mit HDI *S. pyogenes* in Relation zur Kontrolle. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt und bei der Auswertung zu 100 % gesetzt. Die Zellen wurden sowohl mit *S. pyogenes* und den mAk, als auch mit beiden Kombinationen (Bakterien + mAk) koinkubiert. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. *p<0,05 (Werte normalverteilt); #p<0,05 (Werte nicht normalverteilt). 48
- Abb. 16: Darstellung des Anteils vitaler Pankreaskarzinomzellen der Zelllinie MIA PaCa-2 nach 24, 48 und 72 h Behandlung mit EI *S. pyogenes* in Relation zur Kontrolle (unbehandelte Zellen zu 100 % gesetzt). Die Zellen wurden sowohl mit *S. pyogenes* und den mAk, als auch mit beiden Kombinationen (Bakterien + mAk) koinkubiert. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. *p<0,05 (Werte normalverteilt); #p<0,05 (Werte nicht normalverteilt). 49
- Abb. 17: Darstellung des Anteils vitaler Pankreaskarzinomzellen der Zelllinie T3M4 nach 24, 48 und 72 h Behandlung mit EI *S. pyogenes* in Relation zur Kontrolle (unbehandelte Zellen zu 100 % gesetzt). Die Zellen wurden sowohl mit *S. pyogenes* und den mAk, als auch mit beiden Kombinationen (Bakterien + mAk) koinkubiert. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. *p<0,05 (Werte normalverteilt). 50
- Abb. 18: Darstellung des Anteils vitaler Kolonkarzinomzellen der Zelllinie HCT116 nach 24, 48 und 72 h Behandlung mit EI *S. pyogenes* in Relation zur Kontrolle (unbehandelte Zellen zu 100 % gesetzt). Die Zellen wurden sowohl mit *S. pyogenes* und den mAk, als auch mit beiden Kombinationen (Bakterien + mAk) koinkubiert. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. *p<0,05 (Werte normalverteilt); #p<0,05 (Werte nicht normalverteilt). 51
- Abb. 19: Repräsentative Histogramme der T3M4 Zellen zum Zeitpunkt 48 h. Im Histogramm links ist die Verteilung der Zyklusphasen der unbehandelten Zellen und rechts nach der Koinkubation mit *S. pyogenes* und Trastuzumab dargestellt. Die Zellen zeigen nach der Behandlung eine Verschiebung der Zellzyklusphasen

mit deutlichem Anstieg des S-Peak und Abnahme des G2/M-Peak (Auswertung mittels ModFit <i>LTTM-Software</i>).	52
Abb. 20: Darstellung der Zellzyklusverteilung der Zelllinie MIA PaCa-2 nach 24, 48 und 72 h Behandlung mit EI <i>S. pyogenes</i> . Die Zellen wurden mit <i>S. pyogenes</i> , den mAk und den Kombinationen behandelt. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$ (Werte normalverteilt); # $p < 0,05$ (Werte nicht normalverteilt).	53
Abb. 21: Darstellung der Zellzyklusverteilung der Zelllinie T3M4 nach 24, 48 und 72 h Behandlung mit EI <i>S. pyogenes</i> . Die Zellen wurden mit <i>S. pyogenes</i> , den mAk und den Kombinationen behandelt. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$ (Werte normalverteilt); # $p < 0,05$ (Werte nicht normalverteilt).	53
Abb. 22: Darstellung der Zellzyklusverteilung der Zelllinie HCT116 nach 24, 48 und 72 h Behandlung mit EI <i>S. pyogenes</i> . Die Zellen wurden mit <i>S. pyogenes</i> , den mAk und den Kombinationen behandelt. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$ (Werte normalverteilt); # $p < 0,05$ (Werte nicht normalverteilt).	54
Abb. 23: Darstellung der quantitativen Analyse der vitalen Zellen der Zelllinie MIA PaCa-2 nach 24, 48 und 72 h Inkubationszeit mit <i>S. pyogenes</i> , Trastuzumab bzw. Panitumumab und den beiden Kombinationen von Bakterien und mAk in Relation zur Kontrolle. Zu jedem Ansatz wurden 1×10^6 PBMC hinzugefügt. Als Kontrolle dienten Tumorzellen, die nur mit PBMC koinkubiert und bei der Auswertung zu 100 % gesetzt wurden. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$ (Werte normalverteilt); # $p < 0,05$ (Werte nicht normalverteilt).	57
Abb. 24: Darstellung der quantitativen Analyse der vitalen Zellen der Zelllinie HCT116 nach 24, 48 und 72 h Inkubationszeit mit <i>S. pyogenes</i> , Trastuzumab bzw. Panitumumab und den beiden Kombinationen von Bakterien und mAk in Relation zur Kontrolle. Zu jedem Ansatz wurden 1×10^6 PBMC hinzugefügt. Als Kontrolle dienten Tumorzellen, die nur mit PBMC koinkubiert und bei der Auswertung zu 100 % gesetzt wurden. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$ (Werte normalverteilt); # $p < 0,05$ (Werte nicht normalverteilt).	58
Abb. 25: Effekte von mAk auf das Immunsystem.	61

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Histologische Klassifikation des kolorektalen Karzinoms anhand der UICC-Stadien (modifiziert nach Herold G <i>et al.</i> , 2009d)	4
Tab. 2:	Anteil der Tumorzellen mit EGFR und Her2/neu auf der Zelloberfläche	65
Tab. 3:	Mutationsprofil der untersuchten Zelllinien	68

1 Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom (KRK)

1.1.1 Epidemiologie

Das Karzinom des Kolons stellt in Deutschland die dritthäufigste maligne Erkrankung des Mannes und die zweithäufigste der Frau dar. Bei einer Inzidenz von 25/100.000 Einwohnern/Jahr (Bühling KJ *et al.*, 2004) liegt der Altersgipfel der Erkrankung zwischen 60 und 65 Jahren (Greten TF, Kubicka S, 2007a).

1.1.2 Ätiologie

Bei multifaktorieller Ätiologie maligner Erkrankungen sind die wichtigsten Risikofaktoren für das KRK mit jeweils 30 % Zigarettenrauchen und Alkoholkonsum. Auch Infektionskrankheiten spielen mit 18 % eine große Rolle bei der Entstehung. Für die restlichen 22 % kommen exogene und endogene Faktoren, wie Ernährung (hoher Fett- und Fleischanteil, reduzierter Ballaststoffgehalt der Nahrung), Lebensstil (wenig Bewegung) und medizinische Ursachen, wie immunsuppressive Therapien, Strahlentherapien und andere Medikamente in Frage (Seufferlein T, 2007). Präkanzerosen, wie Adenome und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, können zu Kolonkarzinomen entarten. Ebenfalls sind verschiedene genetische Dispositionen mit einem erhöhten Risiko für das KRK assoziiert.

1.1.3 Pathogenese

Die Entstehung des KRK aus Adenomen wurde erstmals von Vogelstein und Fearon systematisch beschrieben. Aus hyperproliferativen Epithelzellen des Kolons können einzelne Zellen klonal expandieren und ein Adenom bilden. Adenome sind benigne epitheliale Tumoren mit einer hohen Entartungsrate. Dieses Risiko steigt mit der Größe des Adenoms und korreliert mit dem Adenomtyp. Es sind drei verschiedene Adenomtypen bekannt. Die höchste Entartungsrate (20 - 40 %) findet sich beim villösen Typ. Dieser wächst breitbasig und verfügt über eine zottige Oberfläche. Mikroskopisch sind fingerartige Schleimhautzotten zu erkennen, eine exzessive Schleimbildung ist nicht untypisch. Seltener mit 1-10 % entartet der tubuläre Typ. Dieser zeichnet sich durch ein sessiles oder gestieltes Wachstum und eine glatte Oberfläche aus. Mikroskopisch sind Wucherungen der Kryptenschläuche ersichtlich. Der tubulovillöse Typ stellt eine Mischform der genannten Adenomtypen dar und entartet in ca. 20 % der Fälle (Bühling KJ *et al.*, 2004). Bei Durchbruch der Basalmembran spricht man per definitionem von einem Karzinom (Cho KR, Vogelstein B, 1992). Dieser

Entwicklungsvorgang wird auch als Adenom-Karzinom-Sequenz bezeichnet und dauert durchschnittlich zwischen 10 und 15 Jahren (Eikhoff A, Riemann LF, 2000).

Bei der Entartung der Adenome spielen verschiedene Mutationen eine Rolle. Zu den häufigsten Alterationen zählen Mutationen im Tumorsuppressorgen *APC* (*adenomatous polyposis coli*). Das *APC*-Gen ist in 34 - 72 % der sporadischen Kolonkarzinome mutiert (Greten TF, Kubicka S, 2007a). Das APC-Protein ist Teil des Wnt/ β -Catenin-Signalweges, der unter anderem die Zelladhäsion und die Apoptose beeinflusst. Mutationen im *APC*-Gen führen zur Akkumulation von β -Catenin im Zellkern und können eine unkontrollierte Zellproliferation und Invasion der Zellen in umliegendes Gewebe vermitteln. Eine weitere häufige Mutation betrifft das Protoonkogen *KRAS*, dessen Protein eine membranständige GTPase im frühen Signalweg des EGF-Rezeptors ist. Das KRAS-Protein spielt eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion des Tyrosinkinaserzeptors und kann so Zellwachstum, Zellproliferation und Angiogenese vermitteln. Bei einer Mutation im *KRAS*-Gen ist die GTPase unabhängig von einer Ligandenbindung am Rezeptor ständig aktiv und führt so zu einer dauerhaften Stimulation dieser Signalkaskade. *KRAS* Mutationen treten häufig bereits im frühen Stadium der Karzinogenese auf. Sie sind oft assoziiert mit Veränderungen des *DCC* (*deleted in colorectal cancer*)-Gens, dessen Translationsprodukt für die Regulation von Zellwachstum und Differenzierung zuständig ist. Mutationen im *DCC*-Gen wurden bei 47 % der großen Adenome bzw. in 75 % der Kolonkarzinomzellen nachgewiesen. Sie stellen damit frühe genetische Veränderungen auf dem Weg vom Adenom zum Karzinom dar (Cho KR, Vogelstein B, 1992).

Demgegenüber ist eine genetische Alteration im Tumorsuppressorgen *TP53* oftmals erst im späten Stadium der Karzinomentwicklung detektierbar. P53 fungiert als Transkriptionsfaktor und reguliert unter anderem bei DNA-Schäden den Zellzyklus, um DNA-Reparaturmechanismen zu aktivieren oder eine Apoptose zu induzieren (Böcker W *et al.*, 2008).

Neben den zuvor beschriebenen genetischen Mutationen spielen auch epigenetische Veränderungen in der KRK Entstehung eine wichtige Rolle. Diese sind definiert als vererbare Veränderungen der Genexpression unabhängig von Änderungen in der primären DNA Sequenz. Dazu gehören beim KRK die von der Norm abweichende Methylierung der DNA, Chromatinmodifikationen und die Transkription nicht kodierender RNA (Khare S, Verma M, 2012). Die am besten charakterisierte epigenetische Transformation stellt die Methylierung dar. Dabei handelt es sich um ein gehäuftes Auftreten von kovalent gebundenen Methylgruppen an Cytosin, besonders in Cytosin-phosphatidyl-Guanin(CpG)-reichen

Regionen. Diese CpG-reichen Regionen treten hauptsächlich innerhalb von Promotorenregionen verschiedener Tumorsuppressorgene auf. Da eine Hypermethylierung mit einer herabgesetzten Gentranskription assoziiert ist, werden so in vielen KRK Tumorsuppressorgene ausgeschaltet (Migehli F, Migliore L, 2012).

1.1.4 Hereditäre Formen des KRK

Bei mehr als 25 % aller KRK Patienten findet sich eine positive Familienanamnese. Dies verdeutlicht das hohe genetische Risiko bei der Entstehung dieser Tumorentität. Charakteristisch für hereditäre KRK ist ihr frühes Manifestationsalter kombiniert mit einem synchronen oder metachronen Auftreten mehrerer Tumoren (Greten TF, Kubicka S, 2007b). Zu den hereditären KRK gehören die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), das hereditäre nicht polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC, Lynch-Syndrom) und die hamartomatösen Polyposis-Syndrome (HPS) (Jochum W, 2008b).

1.1.5 KRK und chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Patienten mit Colitis ulcerosa weisen ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Darmkrebs auf. Dabei spielt die Erkrankungsdauer eine wichtige Rolle für die Höhe des Risikos. Während nach zehn Jahren Erkrankungsdauer der Pancolitis ein kumulatives Karzinomrisiko von 2,1 % besteht, steigt dieses Risiko 30 Jahre nach Erkrankungsbeginn auf bis zu 17,8 %. Deshalb sollte nach acht Jahren bestehender totaler oder subtotaler Colitis oder nach 15 Jahren linksseitig bestehender Colitis ulcerosa eine jährliche Vorsorgekoloskopie durchgeführt werden (Greten TF, Kubicka S, 2007b). Das Risiko für die Entstehung des Kolonkarzinoms ist auch bei einem M. Crohn erhöht, allerdings weniger stark verglichen mit einer vorbestehenden Colitis ulcerosa (Jochum W, 2008a).

1.1.6 Klinische Symptomatik

Die klinische Symptomatik des KRK ist uneinheitlich und unspezifisch, weshalb es oftmals erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird. Patienten berichten häufig über Leistungsminderung, subfebrile Temperaturen, Müdigkeit, Nachtschweiß und Gewichtsverlust (Herold G *et al.*, 2009a). Bei 25 % der Patienten finden sich schon zum Diagnosezeitpunkt Metastasen. Hämatogen metastasiert das KRK zunächst in die Leber, danach in die Lunge und andere Organe (Herold G *et al.*, 2009c). Für die Einteilung der Tumorstadien können drei Nomenklaturen verwendet werden. Die TNM-Klassifikation ist ein prognoseorientiertes Klassifikationssystem der UICC (*Union internationale contre le cancer*). Sie beschreibt Tumorgröße, den Metastasierungsgrad auf lymphogenem Weg und den Grad

der Fernmetastasierung. Daraus lässt sich eine entsprechende UICC-Stadieneinteilung erstellen. Die Dukes-Klassifikation stellt eine ältere, aber noch gebräuchliche Einteilung dar. Sie wird aber mehr und mehr von der UICC-Klassifikation ersetzt (Tab. 1).

Tab. 1: Histologische Klassifikation des kolorektalen Karzinoms anhand der UICC-Stadien (modifiziert nach Herold G *et al.*, 2009d)

Definition	UICC-Stadium	TNM-System	Dukes
Carcinoma in situ	0	TIS N0 M0	
Ia – Beschränkung auf Submucosa	I	T1 N0 M0	A
Ib – Infiltration in die Muscularis propria		T2 N0 M0	
Infiltration aller Wandschichten	II	T3 N0 M0	B
Überschreitung der Darmwand		T4 N0 M0	
Regionale Lymphknoteninfiltration oder Infiltration der Umgebung	III	Tx N1-3 M0	C
Fernmetastasen	IV	Tx Nx M1	D

TIS Carcinoma in situ

T1-4 Ausmaß der Tumorinfiltration

N0-3 Ausmaß der Lymphknotenmetastasierung bei Untersuchung von mindestens 12 Lymphknoten

M0-1 Fehlende oder vorhandene Fernmetastasen

Tx/Nx jedes T/jedes N

1.1.7 Diagnostik

Neben der Anamnese sind Stuhluntersuchungen einfache Diagnoseverfahren. Allerdings ist der Nachweis von okkultem Blut im Stuhl mittels Guajak-Testkärtchen wenig sensitiv, denn es werden nur ca. 50 – 80 % der Karzinome und 10 – 25 % der Adenome erfasst (Seufferlein T, 2007). Die Koloskopie, die ab dem 55. Lebensjahr alle zehn Jahre zur Sekundärprävention empfohlen wird, hat mit 95 % die höchste Sensitivität und Spezifität für den Ausschluss eines KRK, da während der Untersuchung Proben zur histologischen Sicherung der Diagnose gewonnen werden können. Weitere Möglichkeiten der Diagnostik sind die bildgebenden Verfahren MRT, CT und die CT-Kolonographie, welche vor allem zum präoperativem Staging genutzt werden (Jeong KE, Cairns JA, 2013). Präoperativ sollte auch ein Röntgenbild des Thorax angefertigt werden, um eventuelle Fernmetastasen zu identifizieren. Eine

Abdomensonographie vervollständigt das Staging, da sich hier Lebermetastasen und Aszites diagnostizieren lassen.

1.1.8 Therapiekonzepte

Den gegenwärtig einzig kurativen Therapieansatz stellt die chirurgische Entfernung des Tumors dar. Dabei wird eine En-bloc-Resektion des tumortragenden Darmabschnitts inklusive des Mesenteriums und des regionalen Lymphabflussgebietes unter genügend Sicherheitsabstand durchgeführt. Um das Risiko einer intraoperativen Metastasierung so gering wie möglich zu halten, wurde 1952 die sogenannte „no touch“-Therapie eingeführt (Barnes JP, 1952; Herold G *et al.*, 2009b). Beim Kolonkarzinom im UICC Stadium III verbessert die adjuvante sechsmonatige Gabe von Oxaliplatin, 5-Fluoruracil (5-FU) und Folsäure die 5-Jahres-Überlebensrate auf bis zu 70 % (Herold G *et al.*, 2009b). Bei einem palliativen Therapieansatz werden oftmals Umgehungsanastomosen oder ein Anus praeter angelegt, um die Lebensqualität der Patienten zu steigern. Das metastasierte Kolonkarzinom wird mit einer Polychemotherapie behandelt, die aus 5-FU oder Capecitabin in Kombination mit Oxaliplatin besteht (Herold G *et al.*, 2009b). Neuere Therapieansätze stellen monoklonale Antikörper (mAk) dar, die gegen Rezeptoren des Wachstums- und Vermehrungszyklus der Zellen gerichtet sind (Abb. 1) und auf Tumorzellen häufig vermehrt exprimiert werden. Dazu gehört der mAk Bevacizumab, der den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) neutralisiert. So wird eine Ligandenbindung an den VEGFR verhindert und die Angiogenese unterbunden. Weitere mAk stellen Panitumumab und Cetuximab dar. Diese sind gegen den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF, *epidermal growth factor*)-Rezeptor gerichtet (Folprecht G, 2007; Herold G *et al.*, 2009b). Der EGF-Rezeptor (EGFR) gehört zu der Familie der HER-Rezeptoren, die alle aus einem extrazellulären, einem transmembranen und einem intrazellulären Anteil, welcher Tyrosinkinase-Aktivität besitzt, bestehen. Die Bindung eines Liganden an den extrazellulären Anteil des Rezeptors führt letztendlich zur Modulation von Zellwachstum und einer Vielzahl anderer zellulärer Funktionen (Löhr JM *et al.*, 2003c).

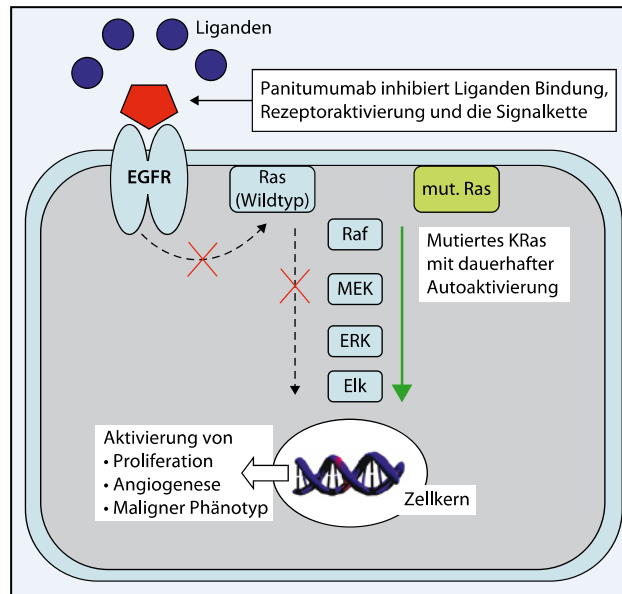


Abb. 1: Schematische Darstellung der Wirkung von mAk auf den EGF-Rezeptor. MAk (hier: Panitumumab) besetzen die Ligandenbindungsstellen der überexprimierten Rezeptoren und verhindern so eine effiziente Signaltransduktion. Im Ergebnis werden antiapoptotische, proliferative und angiogenetische Effekte unterdrückt. (Dietel M *et al.*, 2008)

Panitumumab ist derzeit in der Monotherapie des metastasierten KKRK zugelassen. Allerdings korreliert die Expression von EGFR in der Immunhistochemie wider Erwarten nicht mit der Ansprechrate auf Panitumumab. Es existiert jedoch eine gewisse positive Korrelation mit dem Auftreten und dem Schweregrad des charakteristischen akneformen Hautexanthems („Rush“). Als weiterer Surrogatmarker für eine erfolgreiche Therapie mit Panitumumab wird der Mutationsstatus von *KRAS* erhoben. Es konnte gezeigt werden, dass ausschließlich Patienten, bei denen keine Mutation in diesem Gen vorliegt, von der Therapie profitieren, wohingegen Patienten mit mutiertem Protein keinen Überlebensvorteil haben (Al-Batran SE, Jäger E, 2007). Neuere molekularpathologische Untersuchungen haben gezeigt, dass neben *KRAS* auch der Mutationsstatus von *BRAF* und *PTEN* prognostische Relevanz hat (Tan C, Du X, 2012). Neben Operation, Chemotherapie und Bestrahlung werden neue Ansätze für eine effektive Tumorthherapie gesucht, die weniger Nebenwirkungen besitzen, da bei den genannten Therapien neben den Tumorzellen häufig auch gesunde Zellen geschädigt werden. MAk, die sich spezifisch gegen tumorassoziierte Oberflächenantigene richten, sind teilweise zur Therapie zugelassen. Weitere Moleküle, die auf eine Hemmung von Rezeptortyrosinkinasen zielen, befinden sich in der Entwicklung bzw. präklinischen Phase. Diese Rezeptoren sind oftmals in Neoplasien dereguliert und können daher Proliferation, Migration, Angiogenese, Stromainvasion und Resistenz gegenüber Apoptose vermitteln (Marmor MD *et al.*, 2004). Sie können bei ihrer Aktivierung sowohl Homo-, als auch Heterodimere mit anderen Rezeptoren ihrer Familie ausbilden. Trastuzumab (Herceptin®) ist ein chimärer Her2/neu-spezifischer mAk, der bisher für die Therapie des Her2/neu positiven

Mammakarzinoms zugelassen ist. Mann *et al.* haben gezeigt, dass Trastuzumab die Koloniebildung der Kolonkarzinomzelllinie HCA-7 inhibiert. Ähnliche antitumorale Effekte zeigten sich im Xenograft-Mausmodell mit HCA-7 Tumoren (Mann M *et al.*, 2001). Giannopoulou und Mitarbeiter konnten durch Behandlung mit Trastuzumab eine Inhibition der Proliferation von CaCo-2 Zellen nachweisen, die mit einer verminderten Menge EGF-Rezeptor mRNA (*messenger ribonucleic acid*) verbunden war (Giannopoulou E *et al.*, 2009). Ein Tyrosinkinaseinhibitor des EGF-Rezeptors ist Gefitinib, welches derzeit für die Behandlung des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms zugelassen ist (Bareschino MA *et al.*, 2011). Weiterhin existieren experimentelle Studien, die eine Inhibition der Proliferation von KRK Zellen durch Gefitinib belegen (Cunningham MP *et al.*, 2006; Giannopoulou E *et al.*, 2009).

1.2 Das Pankreaskarzinom

1.2.1 Epidemiologie

Das Pankreaskarzinom ist eines der Karzinome mit der höchsten Mortalität, da die Diagnosestellung oft erst im metastasiertem Stadium erfolgt und bisher nur unzureichende Therapiemöglichkeiten bestehen (Löhr JM *et al.*, 2003b). Die Inzidenz liegt bei 10/100.000 Einwohnern, sodass das Pankreaskarzinom nach dem Kolon- und Magenkarzinom den dritthäufigsten Tumor des Gastrointestinaltrakts darstellt. Der Altersgipfel der Erkrankung liegt zwischen 68 und 70 Jahren (Herold G *et al.*, 2009e).

1.2.2 Ätiologie

Die Ätiologie ist unbekannt, allerdings spielt die genetische Disposition eine wichtige Rolle. Weitere Risikofaktoren sind Rauchen und ein übermäßiger Alkoholkonsum (Herold G *et al.*, 2009e). Ein diskreter Zusammenhang besteht zwischen einer übermäßigen fett- und proteinreichen Ernährung und dem Auftreten des Pankreaskarzinoms. Obst und Gemüse scheinen andererseits als protektive Faktoren zu fungieren. Des Weiteren ist das Risiko für ein Pankreaskarzinom stark erhöht bei Patienten, die an alkoholischer oder auch an idiopathischer chronischer Pankreatitis leiden (Andrén-Sandberg Å, Bäckman PL, 2000). In mehreren Studien wurde der Zusammenhang von Diabetes mellitus und dem Pankreaskarzinom belegt. Patienten mit einem länger als fünf Jahren bestehenden Diabetes weisen eine Verdoppelung des Karzinomrisikos auf (Löhr JM *et al.*, 2003a). Beim sehr seltenen familiären Pankreaskarzinom kann eine Mutation im BRCA-2-Gen vorliegen (Klöppel G *et al.*, 2008a).

1.2.3 Pathogenese und Morphologie

Obwohl nur etwa 10 - 30 % der Zellen des exokrinen Pankreas duktales Ursprungs sind, handelt es sich in 80 - 90 % der Pankreastumoren des exokrinen Anteils um ein duktales Adenokarzinom (Zamboni G *et al.*, 2000). Trotz des duktales Phänotyps ist der genaue Ursprung der Adenokarzinomzellen noch nicht geklärt. Neben differenzierten duktales Pankreaskarzinomzellen werden auch Tumorstammzellen als Ursprung in Betracht gezogen (Rasheed ZA *et al.*, 2010). Dabei kann es sich um Zellen handeln, die sich von Knochenmarkstammzellen ableiten, um gewebsspezifische Stammzellen oder um somatische Zellen, die einen Transdifferenzierungsprozess durchlaufen haben (Bjerkvig R *et al.*, 2005). Diese Tumorstammzellen können für die Tumorentstehung und das Wachstum mitverantwortlich sein. Außerdem sind sie zur Selbsterneuerung und zur Bildung neuer differenzierter Nachkommen fähig. Beim Pankreaskarzinom machen diese CD24, CD44 und ESA auf ihrer Oberfläche tragenden Zellen 0,2-0,8 % der Tumorzellenmasse aus (Mullapudi B *et al.*, 2010b). Der Tumor tritt bevorzugt (70 % der Fälle) im Pankreaskopf auf. Bei Diagnosestellung ist er meist schon mehrere Zentimeter durchmessend. Durch die Lage im Pankreaskopf kann es zu einer Stenose des *Ductus choledochus* und häufig auch des *Ductus pancreaticus* kommen und somit zum cholestatischen Ikterus. Die perineurale Infiltration ist prognostisch ungünstig und führt zu starken Schmerzen (Fibbe C *et al.*, 2000). Sowohl die Aktivierung von Onkogenen, als auch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch Mutationen spielen eine Schlüsselrolle in der Entstehung des Pankreaskarzinoms. Einen dritten molekularen Pathomechanismus in der Entstehung von Pankreaskarzinomen stellen Defekte in DNA *mismatch* Reparaturgenen dar (Freitas D *et al.*, 2009). In 95 % der Fälle ist das *KRAS* Onkogen mutiert (Almoguerra C *et al.*, 1988). Die *KRAS* Mutation ist eine sehr frühe genetische Veränderung in der Entwicklung von normalem Pankreasgewebe zu einem Adenokarzinom, welche bereits in atypischen hyperplastischen Gangepithelien nachweisbar ist. Der Mutationsstatus korreliert mit dem Gesamtüberleben (Finkelstein SD *et al.*, 1994). Bei 60 % der Karzinome ist eine Punktmutation im *TP53* Tumorsuppressorgen detektierbar. Die Mutation des *TP53*-Gens ist die häufigste genetische Aberration in malignen Tumoren des Menschen (Hahn SA, Schmiegel WH, 1998). Das Protein p53 ist ein kleines Phosphoprotein, das spezifisch an DNA-Sequenzen binden kann und somit die Transkription aktiviert. Kleine Änderungen in der Aminosäuresequenz können die Bindungsfähigkeit von p53 verhindern (Kern SE *et al.*, 1991). Obwohl diese Mutation in verschiedensten Phasen der Tumorentstehung auftreten kann, ist sie vor allem mit späteren Stadien des Tumorwachstums assoziiert (Scarpa A *et al.*, 2000). Eine weitere Mutation betrifft das *CDKN2A* Gen, die in

beinahe 100 % der Adenokarzinome des Pankreas auftritt (Schutte M *et al.*, 1997). *CDKN2A* kodiert für ein Protein (p16^{INK4A}), das an die cyclinabhängigen Kinasen CDK4 (*cyclin dependent kinase 4*) oder CDK6 bindet und die Interaktion der Kinase mit Cyclin D1 behindert. So führt eine Inaktivierung des Gens zu einer Unterbrechung des Signalweges, der normalerweise antiproliferativ wirkt (Scarpa A *et al.*, 2000). Darüber hinaus werden in 50 % der untersuchten Proben biallelische Alterationen im *DPC4* (*deleted in pancreatic cancer, 4*)-Gen gefunden. Das Produkt des *DPC4*-Gens ist ein Transkriptionsfaktor (Smad4), der in den TGFβ (*transforming growth factor β*) Signalweg involviert ist. Dieser Signalweg inhibiert epitheliales Zellwachstum und verliert seine Funktion mit der Mutation des Gens (Hahn SA *et al.*, 1996). Oftmals sind mehrere Genmutationen miteinander kombiniert, zum Beispiel die Veränderungen in den Genen *CDKN2A*, *TP53* und *DPC4* (Scarpa A *et al.*, 2000). Durch das beschriebene Mutationsspektrum werden beim Pankreaskarzinom auf der einen Seite Wachstumsstimuli (*KRAS*, Überexpression von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren) geboten, auf der anderen Seite sind Zellzykluskontrolle (*CDKN2A*) und Apoptoseinduktion (*TP53*) inhibiert. Das Zusammenspiel dieser Faktoren kann das aggressive Wachstumsverhalten und die schlechte Prognose dieses Tumors erklären (Löhr JM *et al.*, 2003c). Einen dritten Aspekt in der Tumorigenese stellt die Mutation in DNA *mismatch* Reparaturgenen wie *MLH1* (MutL homolog 1) und *MSH2* (MutS homolog 2) dar. Allerdings sind diese Genomveränderungen, die sich vor allem beim HNPCC finden (Papadopoulos N, Lindblom A, 1997), nur bei etwa 5 % der Pankreaskarzinome zu detektieren. Ein Funktionsverlust der DNA *mismatch* Reparaturgene kann ein erhöhtes Risiko für die Pankreaskarzinomentstehung bei Patienten mit positiver HNPCC Familienanamnese zur Folge haben (Freitas D *et al.*, 2009). Telomerase, ein Ribonukleoprotein, das Telomer-DNA an Chromosomenenden synthetisiert, ist in somatischen Zellen normalerweise inaktiv. In vielen Tumoren findet sich eine Aktivierung der Telomerase, was die Zelle zu einer erhöhten Zellteilungsrate befähigt. In 95 - 100 % maligner Pankreastumoren ist eine Telomeraseaktivität nachweisbar, die als wachstumsgeschwindigkeitsbestimmender Schritt in Pankreastumoren angesehen werden kann (Jean ME *et al.*, 2001).

Histologische Veränderungen in der Entwicklungsgeschichte des Pankreaskarzinoms sind präneoplastische Gangläsionen. Ähnlich den Beschreibungen von Vogelstein und Fearon der Adenom-Karzinom-Sequenz bei der Genese des KRK entsteht aus geringgradigen Abweichungen im Pankreasgangepithel ein Karzinom (Abb. 2). PanIN (pankreatische intraepitheliale Neoplasie) 1A und 1B stellen proliferative Regionen ohne außergewöhnliche Kernatypien dar. Sie können eine flache oder papilläre Architektur aufweisen. PanIN 3 ist

assoziiert mit verschiedenen Kern- und Architekturtypen, allerdings ist die Basalmembran noch intakt. PanIN 2 stellt die Übergangsform zwischen PanIN 1 und 3 dar. PanINs entstehen in kleinen Gängen (Durchmesser $< 5 \text{ mm}$) und sind nicht invasiv (Takaori K *et al.*, 2004). Die schweren intraduktalen Neoplasien des PanIN 3 Stadiums können schließlich in ein duktales Adenokarzinom übergehen (Herold G *et al.*, 2009e). Das histologische Bild zeigt atypische, jedoch meist noch relativ gut differenzierte gangartige Drüsenstrukturen mit Schleimproduktion. Die atypischen Drüsen infiltrieren in das Pankreasgewebe und induzieren in ihrer Umgebung eine Stromareaktion (Desmoplasie). Beim Pankreas, das nicht durch eine Kapsel abgegrenzt wird, breiten sich Tumoren frühzeitig lymphogen und perineural im retroperitonealen peripankreatischen Fettgewebe aus. Die ersten Metastasen finden sich in den regionären Lymphknoten, nach hämatogener Metastasierung sekundär auch in der Leber (Klöppel G *et al.*, 2008a).

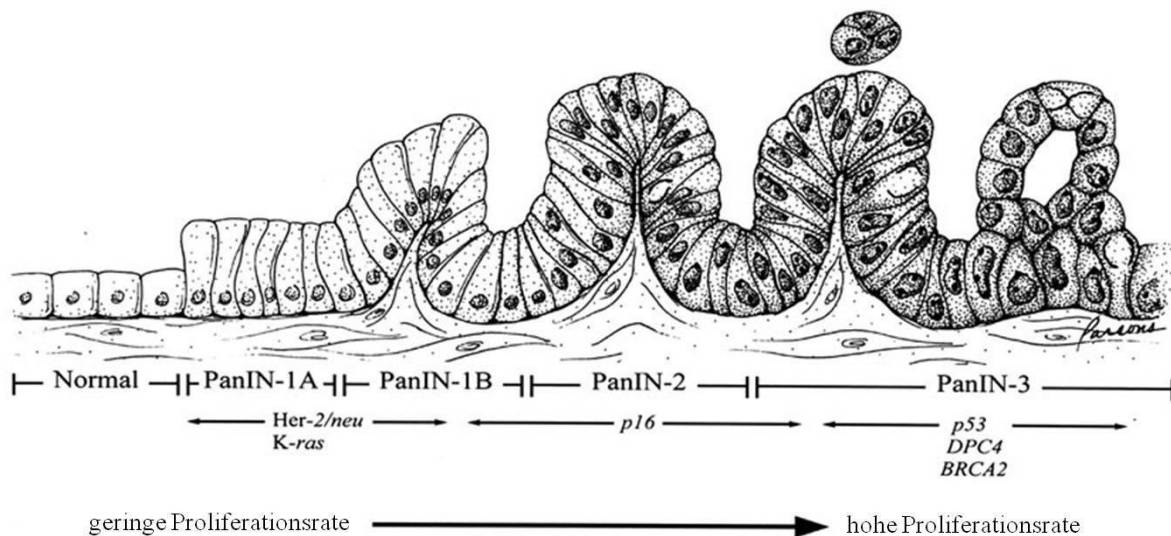


Abb. 2: Schematische Darstellung der PanIN Läsionen und deren wichtigsten molekulargenetisch nachweisbaren Mutationen. (modifiziert nach: Klein WM *et al.*, 2002)

Andere, seltenere Tumoren des exokrinen Pankreas sind das seröse Zystadenom, das muzinöse Zystadenokarzinom und das Azinuszellkarzinom (Klöppel G *et al.*, 2008b). Mit einer Prävalenz von 1/100.000 sind auch die Tumoren des endokrinen Pankreas relativ selten. Insulinome und Gastrinome (zusammen 60 %) sind neben nichtfunktionellen Tumoren (30 %) die häufigsten (Komminoth P *et al.*, 2008).

1.2.4 Klinische Symptomatik

Die Früherkennung des Pankreaskarzinoms wird durch eine unspezifische klinische Symptomatik erschwert. Es zeigen sich Gewichtsverlust, Schmerzen, Ikterus, acholischer Stuhl, Inappetenz, Erbrechen, Diarrhoe, Leistungsabfall und Pruritus. Dabei treten die ersten drei Symptome sehr spät auf und weisen auf einen schon fortgeschrittenen Tumor hin. Ein

häufigeres Symptom ist das sogenannte Courvoisier-Zeichen, das einen Ikterus und eine schmerzlose prall-elastische Gallenblase bei tumorbedingt verschlossenem *Ductus choledochus* bezeichnet (Bühling KJ *et al.*, 2008). Über 80 % der Patienten mit einem Pankreaskarzinom weisen eine eingeschränkte endokrine Pankreasfunktion auf (Graeven U *et al.*, 2000). In fast 50 % der Fälle erfolgt eine Diagnosestellung erst in einem bereits metastasierten Stadium der Erkrankung (Löhr JM *et al.*, 2003d). Das Pankreaskarzinom wird in vier UICC-Stadien eingeteilt (Herold G *et al.*, 2009e):

- I – Tumor auf das Pankreas beschränkt
- II – Pankreas und angrenzende Gewebe betroffen
- III – Beteiligung der regionalen Lymphknoten
- IV – Fernmetastasen

1.2.5 Diagnostik

Die Anamnese und die klinische Untersuchung gehören zur Basisdiagnostik bei einem Patienten mit Verdacht auf ein Pankreaskarzinom. Bei der Labordiagnostik liegen die Serum-Amylase- und Lipasewerte fast immer im Normbereich. Die Tumormarker CA19-9 (*carbohydrate antigen 19-9*, Carbohydratantigen 19-9) und CEA (Carcinoembryonales Antigen) sind nicht spezifisch für das Pankreaskarzinom und können gegebenenfalls nur als therapeutische Verlaufskontrolle dienen. Die abdominelle Sonographie ist trotz der untersucherabhängigen Spezifität und Sensitivität eines der ersten bildgebenden Untersuchungsmethoden bei Verdacht auf ein Pankreaskarzinom. Die genaueste Untersuchung bezüglich Tumorgröße und Infiltration stellt der endoskopische Ultraschall dar (Fibbe C *et al.*, 2000). Weitere apparative Untersuchungen zum Staging des Pankreaskarzinoms sind CT und MRT Untersuchungen. Die ERCP (endoskopisch-retrograde Cholangio-Pankreatikographie) vermag sowohl diagnostische als auch therapeutische Aufgaben zu erfüllen.

1.2.6 Therapiekonzepte

Ein kurativer Therapieansatz ist derzeit nur durch eine operative Entfernung des Tumors zu verfolgen. Es werden 3-Jahres-Überlebensraten von 30 % nach einer Operation mit histologisch tumorfreien Resektaträndern angegeben (Marangos IP *et al.*, 2012). Die Indikation zur Resektion stellt sich bei fehlendem Nachweis von Fernmetastasen. Das Resektionsausmaß der En-bloc-Resektion im Sinne einer pyloruserhaltenden Pankreatikoduodenektomie umfasst den Pankreaskopf zusammen mit dem distalen Gallengang, der Gallenblase und dem Duodenum mit den proximalen 2 – 5 cm des Jejunums.

Daneben werden die peripankreatischen Lymphknoten, die Lymphknoten am *Ligamentum hepatoduodenale* und rechts der *Arteria mesenterica superior* entfernt (Kremer B, Schmid A, 2007). Bei ca. 70 % der Patienten stellt sich der Befund zum Zeitpunkt der Diagnose als fortgeschrittenes und inoperables Pankreaskarzinom dar. Ohne Behandlung liegt die Überlebenszeit in diesem Stadium bei 3 - 4 Monaten (Bramhall SR *et al.*, 2001). Als Erstlinientherapie wurde 1996 Gemcitabin zugelassen (Löhr JM *et al.*, 2003e). Es handelt sich um ein Desoxycytidin-Analogon, das in der Zelle zu Gemcitabin-Triphosphat phosphoryliert und anstelle des Desoxycytidin-Triphosphats in die DNA eingebaut wird. Es resultieren Strangbrüche mit konsekutivem Abbruch der synthetisierten DNA-Ketten (Culman J, 2010). Mit der Monotherapie ergibt sich eine Hemmung der Tumorprogression von 25 bis 58 % (Löhr JM *et al.*, 2003e). Die 1-Jahres-Überlebensrate von Patienten, die mit einer Gemcitabinmonotherapie behandelt wurden, liegt bei 18 % (Freitas D *et al.*, 2009).

Da die chirurgische Intervention nur für einen kleinen Teil der Patienten in Frage kommt und die Gabe von Gemcitabin nur eine kurzfristige Überlebensverlängerung erbringt, wird nach weiteren Möglichkeiten für eine effektive, nebenwirkungsarme Therapie gesucht. Hoffnungen werden in die Immuntherapie gesetzt. Das Ziel der Immuntherapie liegt darin, Tumorzellen irreversibel zu schädigen, wobei gleichzeitig möglichst wenige Nebenwirkungen an gesunden Zellen hervorgerufen werden sollen. Die Immuntherapie wird in sechs Klassen eingeteilt. Unter anderem gehören dazu die passive Therapie mittels mAk und der aktiv unspezifische therapeutische Ansatz, zu dem die Gabe einer avitalen Bakterienpräparation gehört (Staib L *et al.*, 1999). Maligne Tumoren sind unter anderem durch autonomes Wachstum charakterisiert: Man beobachtet beim Pankreaskarzinom eine verstärkte Expression von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, die über auto- und/oder parakrine Mechanismen das Wachstum von Pankreaskarzinomzellen stimulieren können. Dazu gehört zum Beispiel EGF (Korc M *et al.*, 1992). Die Karzinomzellen sind so nicht mehr auf die Wachstumsstimulation ihrer Umgebung angewiesen (Hanahan D, Weinberg RA, 2000). Erlotinib ist ein Tyrosinkinaseinhibitor des EGFR, der in einer klinischen Studie mit Gemcitabin kombiniert wurde. Dieser Therapieansatz wurde mit der Gemcitabinmonotherapie verglichen. Als Ergebnis der Studie zeigte die duale Therapieform eine geringe, jedoch signifikante Steigerung der mittleren Überlebenszeit von 5,91 auf 6,24 Monate (Moore MJ *et al.*, 2007). In der Folge wurde die Kombinationstherapie zur Behandlung des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms zugelassen. Multiple andere Kombinationen, vor allem auf der Basis von Gemcitabin konnten bislang ebenfalls nur bescheidene Ergebnisse mit medianen Überlebenszeiten von 5-10 Monaten erzielen (Chames P *et al.*, 2010).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich derzeit viele Arbeitsgruppen mit neuen Therapieansätzen für das Pankreaskarzinom beschäftigen. Allerdings befinden sich die Studien zumeist noch in der präklinischen Phase. Es müssen weiterhin Alternativen für neue Behandlungsoptionen des Pankreaskarzinoms gefunden werden.

1.3 *Streptococcus pyogenes*

S. pyogenes, ein kugelförmiges Bakterium, das gewundene Ketten bildet, wächst fakultativ anaerob und ist grampositiv und unbeweglich (Abb. 3, siehe S. 14). Die Einteilung der Gattung *Streptococcus* erfolgt nach ihrem Hämolyseverhalten (alpha-, beta-, gamma-Hämolyse), der Antigenstruktur von Zellwandbestandteilen (Lancefield-Schema) und dem Sauerstoffbedarf. Die humanpathogene Art *S. pyogenes* gehört zu der Gruppe der A Streptokokken. Diese sondern Hämolsine ab, die zu einer vollständigen Auflösung von Erythrozyten führen (β -Hämolyse) (Hof H, Dörries R, 2005a). Sie verursachen verschiedene Krankheiten, unter anderem Pharyngitis, Tonsillitis, Impetigo, Pneumonien, Myositiden, die nekrotisierende Faszitis und das Streptokokken vermittelte toxische Schocksyndrom (*streptococcal toxic shock syndrome*, STSS). Spätkomplikationen einer Infektion mit Streptokokken bestehen im rheumatischen Fieber und der Glomerulonephritis. Dabei handelt es sich um autoimmune T- und B-Zellreaktionen, die durch *S. pyogenes* getriggert werden (Cunningham M, 2000). Das breite Infektionsspektrum ist jedoch mit einer Antibiotikatherapie (i.d.R. Penicillin G) gut kontrollierbar (Hof H, Dörries R, 2005c). *S. pyogenes* besitzt verschiedene Virulenzfaktoren, die eine erfolgreiche Besiedlung des Organismus ermöglichen. Dazu zählen die Adhäsine, welche das Anhaften an Rezeptoren der Wirtszellen vermitteln. Wichtige Adhäsine stellen die Lipoteichonsäure (Lipoteichoic acid, LTA), die am Fibronektin bindet, das M-Protein, das an CD46 bindet und die Hyaluronsäurekapsel dar (Courtney HS *et al.*, 2002). Das M-Protein ist dabei der primäre Virulenzfaktor von *S. pyogenes*, da es antiphagozytotisch wirkt. Die Hyaluronsäurekapsel vermittelt die Bindung der Streptokokken an CD44⁺ Wirtszellen (Ashbaugh C *et al.*, 2000; Schrager HM *et al.*, 1998; Wessels MR, Bronze MS, 1994; Cywes C *et al.*, 2000). Des Weiteren ist die Kapsel ein wichtiger Faktor bei der Kolonisation (Courtney HS *et al.*, 2002) und hemmt die Phagozytose der Bakterien (Wessels MR, Bronze MS, 1994).

Adhäsion

Die Adhäsion findet in zwei Phasen statt. Zunächst wird über die LTA, das Fibronektinbindeprotein und das Fibronektin eine schwache und reversible Bindung

hergestellt, bevor dann die endgültige und feste Bindung zum Beispiel über das M-Protein an CD46 erfolgt (Courtney HS *et al.*, 2002).

Invasion

Verschiedene Autoren haben für A Streptokokken ein intrazelluläres Überleben über Tage beschrieben (Cue D *et al.*, 1998; LaPenta D *et al.*, 1994). Die Invasion setzt sich aus einem Zusammenspiel von M-Protein, dem Fibronektinrezeptor, Laminin und Integrinen der Wirtszelloberfläche zusammenzusetzen. Es wird eine Aktinpolymerisation induziert, sodass die Streptokokken durch einen Reißverschluss ähnlichen Mechanismus aufgenommen werden (Dombek P *et al.*, 1999).

Hämolysine

Hämolysine sind wichtige Virulenzfaktoren. Zu ihnen gehören Streptolysin O (SLO) und S (SLS). SLO ist ein Exotoxin, das während der exponentiellen und frühen stationären Wachstumsphase produziert wird. Bei SLS handelt es sich um das Oligopeptid, das für den charakteristischen Hof der β -Hämolysen auf Blutagarmedium um die *S. pyogenes*-Kolonien verantwortlich ist (Sierig G *et al.*, 2003).

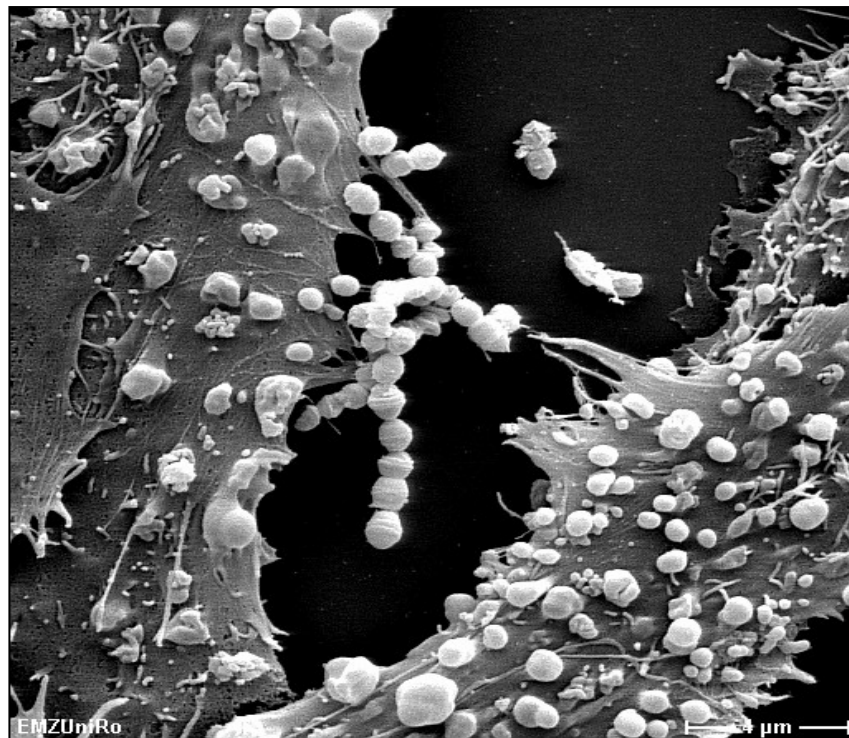


Abb. 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme (Vergrößerung 5000fach) der Bindung von inaktivierten *S. pyogenes* an Pankreaskarzinomzellen der Linie MIA PaCa-2. (Eigene Darstellung)

1.4 Bakterielle Immuntherapie

Das Konzept, Bakterien oder deren Komponenten therapeutisch bei malignen Erkrankungen einzusetzen, ist schon sehr alt. Es existieren Aufzeichnungen aus dem 14. Jahrhundert, die beschreiben, dass Peregrinus Laziosi, bekannt als der katholische Patron der Krebspatienten, unter einem schnell wachsenden Tumor am Unterschenkel litt. Kurz vor der geplanten Amputation soll der Tumor die Haut durchbrochen und sich infiziert haben. Wenig später war er komplett verschwunden (Hoption Cann SA *et al.*, 2003). Diese frühen Beobachtungen, dass Tumoren infolge von Infektionen in Remission gehen können, führten mit den Pionierarbeiten von William B. Coley zu den Anfängen der Tumorimmunologie. Ende des 19. Jahrhunderts hatte der New Yorker Chirurg die Beobachtung gemacht, dass Patienten, die postoperativ an einer Wundinfektion erkrankten, eine bessere Heilungsrate aufwiesen (Coley WB, 1910). Da die Patienten allerdings oftmals durch die Infektion stark geschwächt wurden, entwickelte er eine avitale Bakterienpräparation, die aus *S. pyogenes* und *Serratia marcescens* bestand und als „Coley's Toxin“ bekannt wurde. 1936 hat die *American Medical Association* (AMA) Coley's Toxin offiziell als Tertiärprävention nach Resektion des Tumors und als Therapeutikum in inoperablen Fällen von Sarkomen empfohlen (Hoption Cann SA *et al.*, 2003). Aufgrund der aufkommenden Erfolge der Radio- und Chemotherapie geriet diese Therapieform jedoch zunächst in den Hintergrund.

Das Prinzip der bakteriellen Immuntherapie ist die Nachahmung einer mikrobiellen Infektion, die eine effektive Immunantwort gegen den Tumor initiiert. In Tumoren herrscht oftmals ein schlecht vaskularisiertes und somit hypoxisches Milieu, in das bekannte Therapeutika nur unzureichend vordringen können. Für anaerobe Bakterien ist diese Umwelt geradezu ideal. Weiterhin haben sie, verglichen mit therapeutisch eingesetzten Viren, viele Vorteile: (1.) sind sie leicht zu produzieren und zu lagern, (2.) gehen sie keine Interaktionen mit der Wirt-DNA ein, (3.) sind sie durch Antibiotika leicht zu eliminieren (Maletzki C *et al.*, 2010). Im Tumor sollen die Bakterien dann zum einen durch Freisetzen lytischer Enzyme (Proteasen, Lipasen), zum anderen durch bakterielle Toxine eine Tumorzellschädigung hervorrufen. Bakterielle Antigenmuster wie unmethylierte CpG-DNA, Flagellin und Fett- und Kohlehydratstrukturen der bakteriellen Zellwand fungieren als Reize für das aktive angeborene Immunsystem. Daraus resultiert eine lokale Entzündungsreaktion mit Einwanderung von Makrophagen, Neutrophilen und Dendritischen Zellen (Souders NC *et al.*, 2008). Die Bakterien tragen damit über die Vermittlung von zellulären Immunreaktionen auch indirekt zur Antitumorimmunität bei (Abb. 4). Die intratumorale Anwesenheit von Lymphozyten stellt einen günstigen prognostischen Faktor dar. Im Gegensatz dazu ist zum Beispiel bekannt, dass Mäuse mit

einem Immundefekt sehr viel schneller zur Entwicklung maligner Tumoren neigen als Mäuse mit einem gesunden Immunsystem (Pagès F *et al.*, 2005).

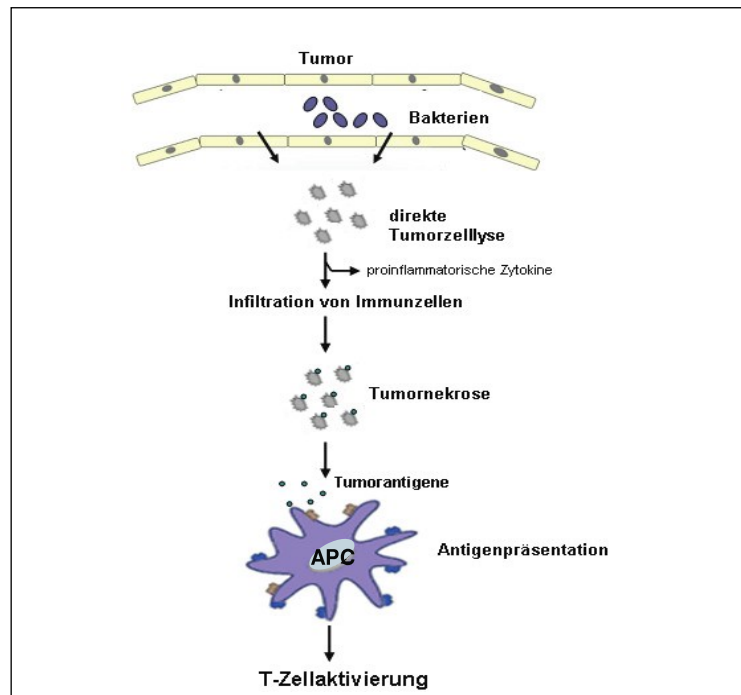


Abb. 4: Schematische Darstellung der bakterienvermittelten Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen. (Maletzki C, 2009, unveröffentlichte Daten)

Verschiedene Arbeitsgruppen haben den Ansatz der bakteriellen Immuntherapie in den letzten Jahren aufgegriffen und versucht, durch Einsatz unterschiedlicher bakterieller Spezies eine effektive Tumorthherapie zu etablieren. Als Beispiel seien die Anaerobier *Bifidobacterium longum* und *Clostridium novyi* genannt. Diese produzieren im anaeroben Umfeld des Tumors reaktive Sauerstoffradikale, Proteasen und andere unspezifische Enzyme, die die Tumorzellen schädigen können (Yazawa K *et al.*, 2001; Agrawal N *et al.*, 2004). Attenuierte, aber dennoch weiterhin invasive Bakterien der Spezies *Salmonella typhimurium* infizieren maligne Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* und triggern dabei eine Immunantwort (Patyar S *et al.*, 2010). Neben *S. typhimurium* wurde auch *C. histolyticum* erfolgreich in experimentellen Studien zur Tumorbekämpfung eingesetzt. Bakterien, die in der Tumorthherapie Verwendung finden, sollten idealerweise folgende Kriterien erfüllen: (1.) sollten sie für den Patienten nicht toxisch sein, (2.) sollten sich diese Bakterien nur im Tumor vermehren können, (3.) wäre es von Vorteil, wenn das Immunsystem des Patienten in der Lage ist, die Bakterien langsam und vollständig zu eliminieren, (4.) sollten die Bakterien nicht immunogen wirken, (5.) im Tumor eine direkte Lyse induzieren und (6.) lokal eine Zytotoxinproduktion anregen (Jain RK, Forbes NS, 2001; Linnebacher M *et al.*, 2011). Die derzeit einzige in der Klinik zugelassene bakterielle Immuntherapie von malignen Erkrankungen stellt die Instillation von *Bacillus Calmette Guérin* (BCG) in die Blase dar. BCG ist die effektivste Therapie für das *Carcinoma*

in situ und das oberflächliche Hochrisiko-Urothelkarzinom der Blase (Porena M *et al.*, 2010). Auch zur Therapie anderer Malignome, zum Beispiel des Malignen Melanoms, wurde BCG in Studien verwendet. In den 1970er Jahren konnte bei intraläsionaler Injektion eine Ansprechrate von 92 % nachgewiesen werden. Andere Arbeitsgruppen sahen eine statistisch signifikant geringere Inzidenz von Leukämie bei BCG-geimpften Neugeborenen (Lamm DL, 2008). Das von den Franzosen Calmette und Guérin attenuierte *Mycobacterium bovis*, das zur Impfung gegen Tuberkulose eingesetzt wurde, wird heute wegen der unsicheren Wirksamkeit und der geringen Inzidenz der Tuberkulose in Deutschland als Impfstoff nicht mehr angewendet (Herold G *et al.*, 2009c).

1.4.1 Eigene Untersuchungen der Arbeitsgruppe

Die Möglichkeit einer erfolgreichen Behandlung von Tumoren mit Bakterien wurde bereits in tierexperimentellen Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe bestätigt. So konnte durch einmalige intratumorale Injektion vitaler Streptokokken eine komplette Remission muriner Pankreastumoren in Mäusen erreicht werden (Maletzki C *et al.*, 2008). Da aber die Applikation lebender Bakterien auch immer das Risiko einer Infektion mit sich trägt, wurden in einem weiteren Ansatz von Linnebacher *et al.* 2008 avitale *S. pyogenes in vivo* appliziert. Bei allen Versuchstieren war der Tumor vier Wochen nach der Injektion kleiner als in der Kontrollgruppe und wies nekrotische Areale an der Injektionsstelle auf. In zwei von sieben Fällen wurde eine vollständige Regression der Tumoren beobachtet. Diese Ergebnisse lassen eine Mitverantwortlichkeit zytotoxischer Immunzellen vermuten, denn in der histologischen Untersuchung der Tumoren machte sich ein starkes Entzündungszellinfiltrat bemerkbar. Systemisch wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe ein leicht erhöhter Anteil an Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen detektiert. Auch ein leichter Anstieg der T-Helfer-Zellen (CD4⁺) war zu verzeichnen. Hauptsächlich fanden sich zytotoxische T-Zellen (CD8⁺). Das proinflammatorische Zytokin TNF- α war ebenfalls erhöht. Als therapeutische Komponenten wurden die Toxine Streptolysin S und O der Streptokokken verantwortlich gemacht (Maletzki C *et al.*, 2012). Diese Toxine zerstören eine signifikante Zahl der Tumorzellen. Das führt zusammen mit anderen bakteriellen Komponenten, wie der LTA, zu einer starken inflammatorischen Reaktion. Daraufhin wandern Makrophagen in den Tumor ein, welche die Bakterien zusammen mit Tumorzellfragmenten aufnehmen und in drainierende Lymphknoten wandern, wo sie T-Lymphozyten die entsprechenden Antigene präsentieren. Die T-Zellen wandern nun zum Tumor und tragen ihren Teil zur Zerstörung des Tumors bei (Linnebacher M *et al.*, 2008; Linnebacher M *et al.*, 2011).

1.4.2 Kombinationstherapie – Konjugation von *S. pyogenes* mit mAk

Neben der Wirkungsanalyse der jeweiligen Monotherapien von Bakterien und mAk war es von einem besonderen Interesse die Wirkung der Kombination aus beiden Therapien zu überprüfen. Mit Hilfe der Konjugation der Bakterien an die mAk soll ein zielgerichteter Transport der Bakterien zu den Tumorzellen realisiert werden. Durch die Überexpression von EGFR und Her2/neu auf den Tumorzellen finden sich die mAk in besonders hoher Konzentration in Tumorzellnähe und können so die Bakterien zu ihrem vorgesehenen Wirkort navigieren. Über das *streptococcal Ig-binding protein (SibA)* sind *S. pyogenes* in der Lage IgG zu binden (Nobbs AH *et al.*, 2009). Die Konjugation der Bakterien an die mAk erfolgt über den Fc-Teil von Trastuzumab oder Panitumumab (Klier U *et al.*, 2012) (Abb. 5). Eine Kombination aus einem mAk und einem zweiten Toxin zur Therapie von Karzinomen wird in der Literatur vielfach beschrieben. Ein Beispiel wäre die Konjugation eines Her2/neu Antikörpers mit Rizin, einem die eukaryote Proteinbiosynthese hemmendem Protein des Wunderbaums (*Ricinus communis*). Durch dieses Konstrukt konnte eine Lyse von Her2/neu positiven Mammakarzinomzellen *in vitro* nachgewiesen werden (Boyer CM *et al.*, 1999).

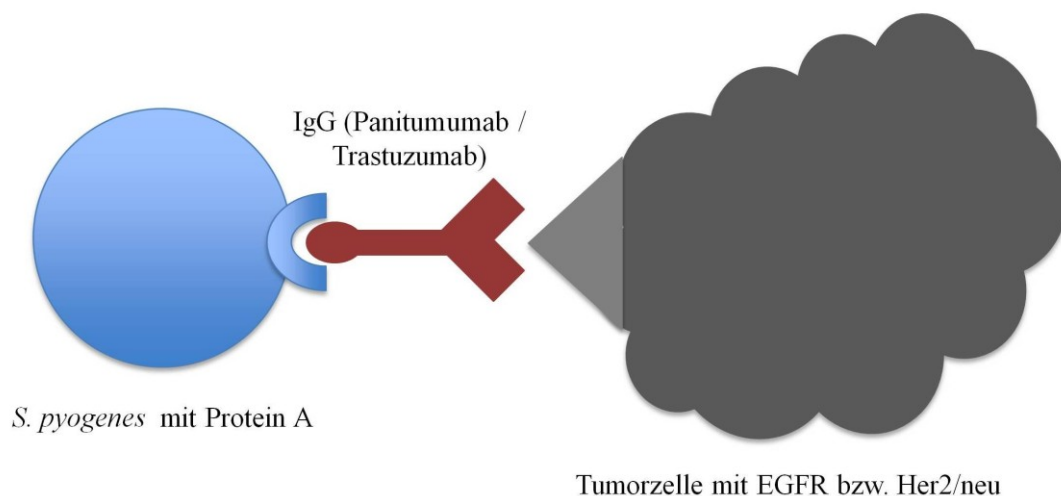


Abb. 5: Schematische Darstellung der Kopplung der mAk über den Fc-Teil an das Protein A der Streptokokken. Mithilfe der Fab-Fragmente wird die Bindung an den EGFR bzw. Her2/neu auf der Tumorzelloberfläche vermittelt. (Eigene Darstellung)

2 Zielstellung

Tumoren des Gastrointestinaltrakts, wie Kolon- und Pankreaskarzinome, stellen trotz verbesserter Therapiekonzepte oftmals Erkrankungen mit ungünstiger Prognose dar. Vor diesem Hintergrund treten Therapiestrategien, die auf immunologischen Ansätzen beruhen, immer mehr in den Fokus aktueller Forschung. So werden vollhumanisierte bzw. vollhumane mAk, die spezifisch gegen Oberflächenstrukturen von Tumorzellen gerichtet sind, zunehmend erfolgreich in der Standardtherapie von Tumorerkrankungen eingesetzt. Diesem hochspezifischen Therapieansatz steht die aktive Sensibilisierung mit mikrobiellen Komponenten gegenüber. Deren Potenzial, sowohl Tumorzellen direkt zu eliminieren, als auch das Immunsystem zu stimulieren, ist bereits bekannt (Maletzki C *et al.*, 2008).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die antitumorale Wirksamkeit einer Kombinationstherapie von mAk und avitalen Bakterien der Gattung *S. pyogenes* zu untersuchen. Folgende Fragestellungen sollten im Einzelnen beantwortet werden:

1. Charakterisierung des direkten Einflusses der mAk Trastuzumab und Panitumumab auf humane Pankreas- und Kolonkarzinomzellen:

Welche Effekte haben mAk auf die metabolische Aktivität, das Wachstumsverhalten und den Zellzyklus von Pankreas- und Kolonkarzinomzellen? Wie unterscheiden sich die Effekte der Antikörper im interzellulären Vergleich?

2. Charakterisierung des direkten Einflusses einer avitalen Streptokokkenpräparation auf humane Pankreas- und Kolonkarzinomzellen:

Wie ist das Invasionsverhalten der Bakterien gegenüber den Karzinomzelllinien charakterisiert? Welchen Einfluss hat die Art der Inaktivierung auf Invasionsverhalten und Zytotoxizität? Wie unterscheiden sich die Effekte in Hinblick auf Zellwachstum, metabolische Aktivität und Zellzyklusveränderungen der einzelnen Zelllinien beider Tumorentitäten nach Zugabe der Bakterienpräparation?

3. Effekte der Kombinationstherapie von mAk und Bakterien:

Wie beeinflusst die Kombination aus mAk und avitalen *S. pyogenes* das Wachstumsverhalten, die metabolische Aktivität und den Zellzyklus?

4. Wirkverhalten der Therapiestrategien bei Anwesenheit immunkompetenter Zellen:

Wie ändert sich die Wirkung der Therapieansätze durch die Anwesenheit immunkompetenter Zellen?

Durch die Beantwortung der aufgeführten Fragen soll ein Überblick über die Immuntherapie des Pankreas- und Kolonkarzinoms gegeben werden. Dabei stehen sich die vergleichsweise alte Therapieoption mit einer avitalen Bakterienpräparation und die vergleichsweise neue Therapieoption mittels hochspezifischer mAk gegenüber. Eine Kombination beider Ansätze ist auf Grund aktueller Literaturangaben für die jeweilige Monotherapie vielversprechend.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Blutagarplatten	Difco
Combitips	Eppendorf
Einwegpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner bio one
FACS-Röhrchen	BD Falcon
Kryoröhrchen	Greiner bio one
Mikrotiterplatte für TaqMan (96-Wellplatten)	Applied Biosystems
Mikrotiterplatten (6-, 12-, 24-, 96-Wellplatten)	BD Falcon
PCR-Tubes	BioZym
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Spitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Greiner bio one
Spitzen, gestopft (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Molecular Bio Products
Zellkulturflaschen (75 mm ² , 175mm ²)	Greiner bio one
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner bio one

3.1.2 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Calcein-AM	Fluka
CFDA (5-Carboxyfluorescein-diacetat)	Biotium
Chloroform	Biochemica
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom AG
Ethanol (96%, 70%, 40%)	Zentralapotheke des Klinikums
Ethidiumbromid Lösung 10 mg/ml	Promega
FACS Flow	Becton Dickinson

Chemikalien	Hersteller
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA
Ficoll	PAA
Glutamin	PAA
Isopropanol	J. T. Baker
Lymphocyte separation medium (LSM)	PAA
Methanol	LabScan
PBS (<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung)	Zentralapotheke des Klinikums
Penicillin	Gibco/Invitrogen
Propidiumiodid	Sigma
RNase	Sigma
Streptomycin	Gibco/Invitrogen
TAE-Puffer pH=8,0 18,61 g NaEDTA x 2 H ₂ O 242 g TRIS (Trisaminomethan) 57 ml Essigsäure auf 1000 ml mit <i>Aqua dest.</i> auffüllen	Sigma Roth J. T. Baker
THY-Medium 36,4 g/l Todd Hewitt Broth (THB) 5 g/l Hefeextrakt	Oxoid Oxoid
Trizol	Invitrogen
Trypanblau	Fluka
Trypsin-EDTA	Gibco/Invitrogen
Tween 20	Sigma
WST-1	Roche

3.1.3 Kits

Kit	Hersteller
cDNA Kit	Applied Biosystems
TaqMan Master Mix	Applied Biosystems

3.1.4 Antikörper

Antikörper	Handelsname	Hersteller
Panitumumab	Vectibix [®]	Amgen
Trastuzumab	Herceptin [®]	Roche
sek. goat anti-human Ak, FITC-gelabelt		Dako

3.1.5 „Assays on demand“ für die TaqMan-Echtzeit-PCR

Gen	Katalognummer	Hersteller
<i>BAX</i>	Hs 00180269_m1	Applied Biosystems
<i>CDKN1A</i> (p21 ^{WAF1})	Hs 00355782_m1	Applied Biosystems
<i>CDKN2A</i> (p16 ^{INK4A})	Hs 00923894_m1	Applied Biosystems
humane <i>GAPDH</i>	Hs 99999905_m1	Applied Biosystems

3.1.6 Geräte

Geräte	Hersteller
CO ₂ -Brutschrank	Nunc Cellstar
ELISA-Reader anthos htIII	Anthos
FACS Calibur	Becton Dickinson
Laminarbox	Heraeus
Mikroskop	Wilovert
Neubauer-Zählkammer	Brand
Pipetten	Eppendorf
Tecan Infinite [®] 200	Tecan

Geräte	Hersteller
Thermocycler	MJ Research
Thermocycler RT-PCR 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems
Vortex	Eppendorf
Waagen	Sartorius analytic Soehnle
Wasserbad	Meding
Zentrifugen Megafuge 1.0R 5415C	Heraeus Eppendorf

3.1.7 Humane Zelllinien

Es wurden humane Karzinomzellen des Pankreas und Kolons verwendet. Alle Zellen wachsen in Kultur adhärent und bilden eine Monolayerschicht aus.

Pankreaskarzinomzellen

Die verwendeten Pankreaskarzinomzelllinien sind BxPC-3, MIA PaCa-2 und T3M4. Sie wurden ursprünglich von der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) bezogen und standen der Arbeitsgruppe vor Beginn der Untersuchungen bereits zur Verfügung.

BxPC-3

Diese Zelllinie stammt ursprünglich aus einem dukalen Adenokarzinom einer 61-jährigen Patientin. Die BxPC-3 Zellen weisen Mutationen in den Genen *TP53* und *DPC4* auf (Brunner TB *et al.*, 2005).

MIA PaCa-2

Die 1975 isolierte Zelllinie wurde aus einem dukalen Adenokarzinom eines 65-jährigen Mannes gewonnen und besitzt Mutationen im *KRAS*, *CDKN2A* und *TP53* Gen (Brunner TB *et al.*, 2005).

T3M4

Die Zellen der Zelllinie T3M4 sind aus einer Lymphknotenmetastase eines Pankreaskarzinoms isoliert worden und im *TP53* Gen mutiert (Seki T *et al.*, 2001). Laut Literaturangaben besteht ein *KRAS* Wildtyp (Kimple RJ *et al.*, 2010), in eigenen

Untersuchungen zeigte sich jedoch eine Mutation im *KRAS* Gen (Institut für Pathologie, Universität Rostock).

Kolonkarzinomzellen

Es wurde mit den KRK-Linien HROC18, HROC60 und HCT116 gearbeitet. HROC18 und HROC60 wurden von der eigenen Arbeitsgruppe etabliert und für die vorliegenden Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

HROC18

Diese Zelllinie eines Adenokarzinoms weist eine *APC* Genmutation auf. Die Zelllinie ist mikrosatellitenstabil (MSS) (Klier U *et al.*, 2012).

HROC60

HROC60 wurde aus einem hochgradig methylierten *CpG island methylator phenotype* (CIMP-h) Adenokarzinom eines 71-jährigen Patienten isoliert (Linnebacher M *et al.*, 2010). Die Zelllinie besitzt eine *APC* Mutation und ist mikrosatellitenstabil (MSS) (Klier U *et al.*, 2012).

HCT116

Die ebenfalls aus einem Adenokarzinom eines Mannes stammende Zelllinie hat eine *KRAS* Mutation. Die Zelllinie ist mikrosatelliteninstabil (MSI) (Klier U *et al.*, 2012).

3.1.8 Monoklonale Antikörper

In dieser Arbeit wurden die vollhumanen mAk Trastuzumab und Panitumumab verwendet.

Trastuzumab mit dem Handelsnamen Herceptin[®] stammt von der Firma Roche. Panitumumab (Vectibix[®]) wurde von der Firma Amgen bezogen. Bei Trastuzumab handelt es sich um einen Her2/neu - Antikörper. Panitumumab ist ein EGF - Rezeptorantikörper.

3.1.9 Bakterienstammhaltung

Es wurden Bakterien der Gattung *S. pyogenes* Serotyp M49 *wt* 591 verwendet, die der Arbeitsgruppe zu Beginn dieser Arbeit bereits zur Verfügung standen. Bei dem Stamm M49 *wt* 591 handelt es sich um ein klinisches Isolat des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Universität Rostock.

3.2 Methoden

3.2.1 Mikrobiologische Methoden

3.2.1.1 Bakterienkultur & -inaktivierung

Für das Anlegen von Übernachtskulturen wurden einzelne Bakterienkolonien mit Hilfe einer Impföse von der jeweiligen Stammplatte entnommen und in 30 ml THY Medium überführt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ über Nacht im Brutschrank. Am darauf folgenden Tag wurde die optische Dichte am Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen und auf OD₆₀₀ = 0,5 eingestellt. Dies entspricht einer Bakterienmenge von 4 x 10⁶ cfu/ml. Anschließend wurden die Bakterien inaktiviert. Es wurden die zwei folgenden Inaktivierungsverfahren eingesetzt:

1. Inaktivierung durch Hochdruck (HDI, Hochdruckinaktivierung)

Mit freundlicher Unterstützung der Orthopädischen Klinik und Poliklinik der Universität Rostock wurde die Bakteriensuspension in einem 15 ml Tube in der Hochdruckanlage für 30 min einem Druck von 400 MPa bei 20 °C ausgesetzt.

Hoher hydrostatischer Druck wird unter anderem in der Lebensmittelindustrie zur Abtötung von pathogenen Keimen eingesetzt (Follonier D *et al.*, 2012). Drücke zwischen 300 und 600 MPa wirken auf die meisten vegetativen Formen von Mikroorganismen inaktivierend (Gollwitzer H *et al.*, 2009). Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in einer Proteindenaturierung (Rivalain N *et al.*, 2010). Bei den hier verwendeten Drücken sind allerdings auch die Proteinbiosynthese, die RNA-Transkription, die DNA-Synthese und die Chromosomenreplikation zum Teil irreversibel geschädigt (Gross M *et al.*, 1993; Yayanos AA, Pollard EC, 1969; Bartlett DH, 2002).

2. Inaktivierung durch Ethanol (EI, Ethanolinaktivierung)

Für die zweite Inaktivierungsvariante wurden die Bakterien durch Ethanol avitalisiert. Dazu wurden die Bakterien mit einer 40 %igen Ethanollösung versetzt und für 30 min unter konstanter Rotation bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Bakterien gewaschen, nochmals die optische Dichte auf OD₆₀₀ = 0,5 eingestellt und in DMEM Medium resuspendiert.

Die Konzentration der Ethanollösung wurde mit 40 % gewählt, da sich aus Voruntersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe diese als praktikabel und zuverlässig inaktivierend bestätigt hat (Stier S, 2009, unveröffentlicht).

Überprüfen der Avitalität

Die Inaktivierung der Bakterien durch Hochdruck oder Ethanol wurde auf ihre Effektivität untersucht, indem Bakterien auf Blutagarplatten (mit 5 % Schafsblut) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert wurden. Nach 24 h wurde die Blutagarplatte auf Koloniebildung untersucht.

Eine Koloniebildung konnte nicht nachgewiesen werden, sodass die Inaktivierung als erfolgreich angesehen und die sterilen Bakteriensuspensionen für die im Folgenden beschriebenen Versuche verwendet wurden.

Bakterien-Antikörperkonjugation

Für die Kombinationsansätze wurden die entsprechenden Mengen an Bakterien und Antikörpern für 30 min bei 4 °C inkubiert, bevor die Suspension mit Medium verdünnt (1:10) zu den Zellen gegeben wurde.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Kultivierung der Zellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter der Laminarbox mit ausschließlich sterilen Materialien durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Als Kulturmedium wurde DMEM Ham's F12 verwendet, wobei Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml), 10 % FKS und L - Glutamin (6 mM) zugesetzt wurden. Das FKS wurde zuvor bei 56 °C für 30 min wärmebehandelt, um Komplementfaktoren zu inaktivieren.

3.2.2.2 Passagieren der Zellen

Zellen werden bei zu dichtem Bewuchs der Zellkulturflasche passagiert, um ihnen weiterhin eine optimale Wachstums Umgebung zu gewährleisten.

Dazu wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und der Flaschenboden mit Hilfe von 1 ml Trypsin/EDTA gewaschen. Das restliche Medium und das Trypsin wurden verworfen. Nun wurden 2-3 ml Trypsin in die Flasche gegeben, um die adhärent wachsenden Zellen durch die Protease Trypsin vom Flaschenboden zu lösen. Es folgte eine zelllinienspezifische Inkubationszeit im Brutschrank. Nach Ablauf dieser Zeit wurde durch leichtes Klopfen gegen die Zellkulturflasche das Ablösen der Zellen unterstützt. Die Reaktion wurde bei fortgeschrittenem Ablösegrad mit 10 ml Medium abgestoppt, um zu verhindern, dass die Protease nicht nur extrazelluläre Proteine zur Ablösung der Zelle spaltet, sondern auch die

Integrität der Zelle angreift. Die Zellen in der Suspension wurden nun gezählt, um die benötigte Menge für die verschiedenen Ansätze zu ermitteln.

3.2.2.3 Zellzählung

Die Zählung der Zellen erfolgte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer unter Verwendung von Trypanblau (1:10 Verdünnung). Vitale Zellen färben sich auf Grund der Integrität ihrer Membran nicht an und können somit unter dem Lichtmikroskop von toten Zellen unterschieden werden. Avitale Zellen, deren Membran für Trypanblau durchgängig ist, erscheinen blau, da ihre intrazellulären Proteine den Farbstoff binden. In der Neubauer Zählkammer wurden die vitalen Zellen in allen vier Großquadranten ausgezählt und die Zellzahl/ml wie folgt berechnet:

$$\text{Ermittelte Zellzahl} / 4 = x$$

$$\text{Verdünnungsfaktor: } 10$$

$$\text{Zählkammerfaktor: } 10^4$$

$$x * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Zählkammerfaktor} = x * 10 * 10^4 = \text{Zellen/ml}$$

3.2.2.4 Auftauen und Einfrieren der Zellen

5 bis 10×10^6 Zellen wurden in einem ml sterilem Einfriermedium bestehend aus 85 % FKS und 15 % DMSO kryokonserviert. Bevor die Zellen in Flüssigstickstoff überführt werden konnten, wurden sie zunächst für zwei Tage in einer Gefrierbox bei -80°C eingefroren.

Zum Auftauen wurde die Suspension schnell auf 37°C erwärmt und in ein mit Medium gefülltes Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation (5 min, $300 \times g$, 20°C) wurde das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche gegeben. Am darauf folgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

3.2.2.5 Isolierung von PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) aus humanem Vollblut

Die PBMC (Lymphozyten und Monozyten) wurden aus humanem Spendervollblut isoliert, das vom Institut für Transfusionsmedizin der Universität Rostock bereitgestellt wurde.

Die Isolierung erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation.

Hierzu wurde das humane Spendervollblut mit sterilem 1 x PBS verdünnt (3:2). Anschließend wurde die Suspension vorsichtig auf LSM (*lymphocyte separation medium*; $\delta = 1,077 \text{ g/ml}$) geschichtet, sodass Medium- und Blutphase getrennt blieben. Nun wurde bei $900 \times g$ für 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Die so entstandene Interphase zwischen der Plasma/PBS-Phase und der LSM-Phase enthielt die PBMC und wurde in ein neues Röhrchen überführt. Die Zellen wurden anschließend einmal mit 1 x PBS gewaschen (8 min bei $300 \times g$), der

Überstand wurde dekantiert und die Waschung noch einmal wiederholt. Nach der Resuspension des Pellets in 1 x PBS erfolgte die Zellzählung wie unter Punkt 3.2.2.3. beschrieben.

3.2.2.6 Durchflusszytometrie (FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting)

3.2.2.6.1 Funktionsprinzip

Die Durchflusszytometrie beruht auf dem Prinzip der Zellcharakterisierung anhand ihres Phänotyps kombiniert mit einer quantitativen Analyse.

In Suspension befindliche Zellen werden einzeln von einer Kapillare angesaugt und passieren fokussierte Laserstrahlen. Dabei kommt es zur Zerstreuung des Lichts in zwei Richtungen. Zum einen entsteht durch einen ersten Laser das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC), welches in Abhängigkeit von der Beugung des Lichts dem Volumen der Zelle entspricht. Zum anderen entsteht durch einen zweiten Laser, der rechtwinklig zum ersten steht, das Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*, SSC), das in Abhängigkeit von der Brechung Rückschlüsse auf die Granularität der Zelle und die Größe und Struktur des Zellkerns erlaubt. Die zu untersuchende Zellpopulation wird anhand dieser Kriterien für ein Aufnahme Fenster so ausgewählt, dass sie gut abgrenzbar dargestellt werden kann und von totem und fragmentiertem Zellmaterial, das deutlich geringere FSC-Werte aufweist, leicht zu differenzieren ist.

Weiterhin können für die genaue Charakterisierung einer Zellpopulation Antikörper verwendet werden. Diese binden an zellspezifischen Oberflächenproteinen und sind gleichzeitig mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Passiert die antikörpergebundene Zelle nun den Laser, so wird auch der fluoreszierende Farbstoff detektiert. Das geschieht durch die Emission von Lichtquanten, die durch eine Linse gesammelt werden. Durch Filterauftrennung der gesammelten Lichtstrahlen nach dem Wellenlängenbereich und der Auslenkung zu unterschiedlichen Detektoren, können die Signale verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig quantitativ analysiert werden. Die Intensität der Fluoreszenzsignale ist proportional zur Zahl der pro Zelle gebundenen Antikörper und somit auch proportional zur Zahl der markierten Oberflächenmoleküle.

Das in dieser Untersuchung verwendete Durchflusszytometer FACS Calibur ist mit einem Argonionenlaser ausgestattet, der monochromatisches Licht der Wellenlänge 488 nm mit einer Leistung von 15 mW emittiert.

3.2.2.6.2 Nachweis der Her2/neu- und der EGF-Rezeptoren auf Tumorzellen

Zum Nachweis der Rezeptorexpression wurden 2×10^5 Zellen der jeweiligen Zelllinien zuerst mit dem primären mAk Trastuzumab bzw. Panitumumab für 15 min im Kühlschrank

koinkubiert (2 µg/Ansatz). Nach Abstopfung mit 1 x PBS und Zentrifugation bei 300 x g, sowie Verwerfen des Überstandes, wurde der sekundäre goat anti-human FITC(Fluoresceinisothiocyanat)-gekoppelte Antikörper in einer Konzentration von 10 µg/ml zum Pellet zugegeben und im Folgenden ebenso verfahren, wie nach Zugabe der primären Antikörpern. Die Bestimmung unspezifischer Bindungen und eines Cut-off-Wertes wurden durch die Messung einer negativen Kontrolle, die ausschließlich mit dem sekundären Antikörper gefärbt wurde, durchgeführt.

3.2.2.6.3 Nachweis der Invasion von *S. pyogenes* in Tumorzellen

Die Invasion der Bakterien in die Zellen stellt einen wichtigen Schritt in der Vermittlung der Pathogenität der Bakterien dar. Der Nachweis der Invasion der Bakterien in die Karzinomzellen erfolgte durch eine durchflusszytometrische Messung nach einer Methode von Pils *et al.*, 2006. Hierzu wurden die Bakterien in einem ersten Schritt mit dem Farbstoff CFDA-SE (5-Carboxyfluoresceindiacetat Succinimidylester) gefärbt. CFDA-SE diffundiert passiv durch die Zellmembran und wird in der Zelle durch Esterasen in 5-Carboxyfluorescein umgewandelt. Dieses Produkt fluoresziert bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm und kann durch die enzymatisch veränderte Molekülstruktur die Bakterienzelle nicht mehr verlassen.

Die Färbung wurde vor der Inaktivierung vorgenommen. Dafür wurde die Bakteriensuspension mit CFDA-SE (10 mM) versetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien zweimal mit 1 x PBS gewaschen und in 1 x PBS resuspendiert. Danach erfolgte wie unter 3.2.1.1 beschrieben die Inaktivierung mittels Ethanol oder Hochdruck.

Nach Hinzugabe der Bakterien zu den Tumorzellen wurden die Proben für zwei bzw. 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse. Hierbei wurden intra- und extrazelluläre Bakterien detektiert. In einer zweiten Messung derselben Proben wurde Trypanblau hinzugefügt, welches die Signale der adhärennten Bakterien überlagert. Dieses Vorgehen wird als „Quenching“ bezeichnet und ermöglicht die Quantifizierung der in die Tumorzellen eingedrungenen Bakterien. Die Analyse der Messdaten erfolgte mit der Software CellQuestPro (BD-Biosciences).

3.2.2.7 Zellbehandlung

Die Karzinomzellen wurden stets nach dem gleichen Ansatz behandelt. Zu jeden Versuch wurde eine unbehandelte Kontrollzellgruppe ohne therapeutische Zusätze mitgeführt. Zuerst

wurde der Effekt der *S. pyogenes* Monotherapie untersucht. *S. pyogenes* wurde in einer Konzentration von 4×10^6 cfu/ml eingesetzt. Die Antikörpermonotherapie wurde auf 4 ng/ml mAk konzentriert. Die Konzentrationsverhältnisse wurden für die Kombinationsbehandlung beibehalten.

Alle im Nachfolgenden beschriebenen Versuche wurden jeweils für 24, 48 und 72 h (EI *S. pyogenes*) beziehungsweise für 24 und 48 h (HDI *S. pyogenes*) durchgeführt.

3.2.2.8 Vitalitäts- und Aktivitätsuntersuchungen

3.2.2.8.1 WST-1 Assay – Nachweis der metabolischen Aktivität von Zellen

Für die nähere Charakterisierung der durch die bakterien- bzw. mAk-induzierten Effekte auf die metabolische Aktivität der Tumorzellen wurde der WST-1 (*water soluble tetrazolium*) Assay von Roche verwendet. Dieser Test beruht auf dem Nachweis metabolisch aktiver und somit vitaler Zellen mit einem intakten mitochondrialen Succinat-Tetrazolium-Dehydrogenase-System. Dieses bewirkt eine enzymatische Umsetzung des schwach rot gefärbten Tetrazoliumsalzes WST-1 zum dunkelroten Formazan.

3×10^3 Zellen/Well wurden in einer 96-Well Platte ausgesät und über Nacht im Brutschrank zur Ausbildung eines semikonfluenten Monolayers inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Beimpfung der Platten wie unter 3.2.2.7 beschrieben. Nach Ablauf der 24, 48 bzw. ggf. 72 h Inkubationszeit wurden 20 µl/Well WST-1 Reagenz zugegeben und nach zelllinienspezifischer Reaktionszeit die Absorption photometrisch bei 420 nm (Referenzwellenlänge 650 nm) gemessen.

3.2.2.8.2 Calcein-AM – Nachweis der Zellvitalität

Der Nachweis potenziell zytotoxischer Effekte gegenüber Tumorzellen wurde anhand einer Quantifizierung der lebenden Zellen durch Färbung mit Calcein-AM (Calcein-Acetoxymethylester) durchgeführt. Calcein-AM ist ein Farbstoff, der passiv durch die Zellmembran transportiert werden kann. In der vitalen Zelle spalten unspezifische Esterasen die Acetoxymethylester-Gruppe ab. So entsteht Calcein, welches nun an freie Ca^{2+} -Ionen bindet und grün fluoresziert. Dieser Komplex kann die Zellmembran nicht mehr passieren.

Für diese Untersuchungen wurden 5×10^4 Zellen/Well in eine 24-Well Platte eingesät und über Nacht im Brutschrank zur Monolayerausbildung (60-70 % Konfluenz) inkubiert. Die Zellen wurden am folgenden Tag wie unter 3.2.2.7 beschrieben beimpft. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde das Medium verworfen, die Wells einmal mit 1 x PBS gewaschen und die Zellen mit 200 µl Calcein-AM-Lösung (0,675 µl/ml, 2,7 mM) gefärbt. Die Messung erfolgte am Multiplatten Reader Tecan Infinite® 200 bei einer Extinktion von 495 nm (Emission: 515 nm).

3.2.2.9 Zellzyklusanalyse und Apoptosenachweis mittels SubG1-Peak Analyse

Zur näheren Charakterisierung der durch die mAk vermittelten antiproliferativen Effekte wurde durch Messung des SubG1-Peaks der Anteil apoptotischer Tumorzellen bestimmt.

Es werden zwei Formen des Zelltods unterschieden. Zum einen die Nekrose, die den pathologischen Untergang von Zellen beschreibt und zum anderen die Apoptose, auch natürlicher oder programmierter Zelltod genannt wird. Bei der Apoptose handelt es sich um einen genetisch definierten Prozess, der aktiv zur kontrollierten zellulären Selbstzerstörung führt. Dieser Mechanismus ist wichtig für die schnelle und selektive Eliminierung von überflüssigen, falsch differenzierten und infizierten Zellen. Die Schlüsselenzyme der Apoptose stellen die Caspasen (Cystein-Aspartyl-Proteasen) dar. Sie werden in großer Anzahl kaskadenartig aktiviert und führen durch die systematische Spaltung verschiedener Substrate zu morphologischen Veränderungen (Daniel P, 2008). Diese beginnen mit dem Schrumpfen der Zelle und Ausstülpungen an der Zellmembran, während die inneren und äußeren Membranen intakt bleiben. Die Zelle löst sich aus ihrem Zellverbund. Das Chromatin wird durch aktivierte Endonukleasen degradiert, worauf in Folge dessen 180 - 200 bp lange DNA-Bruchstücke entstehen. Propidiumiodid (PI) bindet an die Basenpaare AT und GC der unbeschädigten DNA, was zu einer intensiven Rotfluoreszenz führt. Wird nun die DNA während der Apoptose degradiert, bindet der Farbstoff zunehmend schlechter an die DNA, womit auch die Rotfluoreszenz schwächer wird. Die daraus resultierende Zunahme von Ereignissen mit schwächerer Rotfluoreszenz wird in der FACS-Analyse links des G0/G1-Peaks sichtbar und als Sub-G1-Peak bezeichnet. Da PI (100 µg/ml) ein nicht zellmembrangängiger DNA interkalierender Farbstoff ist, muss zuvor eine Permeabilisierung der Zellmembran erfolgen, wodurch die DNA aus den Zellen austreten kann.

5×10^4 Zellen wurden in 24-Well Platten ausgesät und nach Adhäsion und Ausbildung eines semikonfluenten Zellrasens am nächsten Tag mit der entsprechenden Menge von *S. pyogenes*, Trastuzumab und Panitumumab beimpft. Nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeit folgte die Zellernte. Dazu wurden sowohl der Kulturüberstand, als auch die Zellen nach Ablösen durch Trypsin/EDTA in ein FACS-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation (300 x g) wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in einem ml 70 %igem Ethanol unter konstanter Rotation resuspendiert. Im Anschluss daran wurde ein weiterer ml Ethanol hinzugefügt. Die FACS-Röhrchen wurden mindestens über Nacht bei -20 °C gelagert. Anschließend wurden die Proben gewaschen (5 min, 300 x g). Schlussendlich wurde das Zellpellet in 200 µl PBS/0,1 % Tween 20 und 1 mg/ml RNase resuspendiert, bei 4 °C inkubiert und die Proben nach Zugabe von 50 µl PI durchflusszytometrisch gemessen.

3.2.2.10 Kokulturuntersuchungen

3.2.2.10.1 MLC (*mixed lymphocyte culture*, gemischte Lymphozytenkultur)

Zunächst wurden 5×10^4 Zellen/Well in eine 24-Well Platte eingesät. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium unter sterilen Bedingung abgesaugt und 1×10^6 PBMC/Well hinzugefügt, bevor das übliche Impfschema durchgeführt wurde. Nach der Inkubation im Brutschrank wurde das Medium verworfen und die Zellen mittels 200 - 300 μ l Trypsin/EDTA abgelöst, bevor die Wells mit 1 x PBS gewaschen wurden. Die Reaktion wurde mit 1 x PBS abgestoppt und die Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation (300 x g, 8 min, 20°C) wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 200 μ l 1 x PBS resuspendiert.

Die Messung der Proben erfolgte durchflusszytometrisch, nachdem 50 μ l PI hinzugegeben und gevortext wurde.

3.2.3 Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1 RNA-Isolierung aus Tumorzellen

Die Isolierung von RNA ist Voraussetzung für die Herstellung komplementärer DNA (cDNA), die darauffolgend mittels *RealTime*-PCR (RT-PCR) analysiert werden kann.

5×10^5 Zellen/Well wurden in 6-Well Platten ausgesät, die über Nacht adhärirten. Am folgenden Tag wurden sie mit Bakterien und mAk behandelt. Nach entsprechender Inkubationszeit im Brutschrank wurde der Überstand abgesaugt und die Wells mit 1 x PBS gespült. Im Anschluss daran wurde Trypsin auf den Zellrasen gegeben. Nach kurzer Inkubation im Brutschrank und Abstoppen der Reaktion mit 1 x PBS wurden die Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte nochmaliges Waschen mit 1 x PBS, dann Hinzufügen in das jeweilige Reaktionsgefäß. Anschließend wurde die Suspension für 5 min bei 900 x g zentrifugiert, gefolgt vom Absaugen des Überstandes. Das Zellpellet wurde in einem ml Trizol resuspendiert. Zur Phasentrennung wurden 0,2 ml Chloroform hinzugegeben und für 15 sec geschüttelt. Nach 3 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension für 15 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Zur RNA-Präzipitation wurden im Anschluss 60 % der farblosen Phase vorsichtig in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nachdem das gleiche Volumen an Isopropanol wie bereits an Flüssigkeit im Reaktionsgefäß vorhanden zugesetzt und das Reaktionsgefäß gevortext worden war, folgte eine zehn minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Nun wurde bei 900 x g für 10 min zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Um die RNA zu waschen, wurde ein ml 75 %iger Ethanol zum Pellet gegeben, gefolgt von Vortexen und Zentrifugation bei 300 x g für 5 min.

Nun wurde nach Dekantieren des Überstandes die RNA getrocknet und danach je nach Ausbeute in 20 bis 50 µl RNase freiem Wasser eluiert. Die anschließende vierminütige Inkubation auf dem Heizblock bei 56 °C diente der besseren Lösung der RNA, die danach sofort auf Eis gegeben wurde.

3.2.3.2 Prüfen der RNA-Länge mittels Agarosegelelektrophorese

Die Länge der RNA, aus der die cDNA synthetisiert werden soll, ist u. a. ausschlaggebend für eine erfolgreiche Analyse, denn sie lässt Rückschlüsse auf die Integrität der gewonnenen RNA zu.

Dazu wurde ein 1,5 %iges Agarosegel gekocht. Anschließend wurde 7,5 µl Ethidiumbromid hinzugegeben und durch Schwenken im noch flüssigen Gel verteilt, um nun in eine Kammer luftblasenfrei gegossen zu werden. Für die Gelelektrophorese wurde 1 µg RNA der jeweiligen Probe mit 1 µl 10 x Ladepuffer und einer entsprechenden Menge an RNase freiem Wasser zu 10 µl aufgefüllt. Das Gel wurde nun in die Gelelektrophoresekammer, die mit 1 x TAE Puffer gefüllt war, gelegt. Es folgte die Zugabe der Proben. In den ersten zehn min erfolgte die Auftrennung bei 80 mV, danach bei 100 mV. Nach einer Stunde wurde das Gel unter UV Licht fotografiert.

Die Auftrennung der RNA erfolgt nach der Größe der Moleküle. Diese wandern entlang des elektrischen Feldes auf Grund ihrer negativen Ladung zum Pluspol und legen in einer bestimmten Zeit einen Weg zurück, der abhängig von ihrer Größe ist.

3.2.3.3 cDNA Synthese

Zur Herstellung von cDNA wurden 500 ng RNA eingesetzt. Es wurde 20 µl PCR-Mastermix, der aus 8 µl 10 x Puffer, 3,2 µl dNTP (Desoxynucleotidtriphosphat), 8 µl *Random Primers* und 4 µl reverser Transkriptase bestand, zu einer RNA-Probe hinzugegeben. Es folgte vorsichtiges Mischen und Anzentrifugieren der Proben. Anschließend wurde die RNA-Suspension im Thermocycler mit folgendem Programm in cDNA umgeschrieben:

25 °C für 10 min

37 °C für 120 min

85 °C für 15 sec

3.2.3.4 Quantitative *RealTime*-PCR mittels TaqMan

Die cDNA wurde mittels quantitativer RT-PCR (*RealTime-Polymerase Chain Reaction*, Echtzeit-Polymerasekettenreaktion) analysiert. Das Prinzip der gewählten sogenannten TaqMan-Variante besteht darin nach jedem PCR-Zyklus eine quantitative Analyse der vorhandenen DNA mittels Fluoreszenzmessung durchzuführen.

Bei der Echtzeit-PCR mit TaqMan-Sonden wird der FRET (*fluorescence resonance energy transfer*, Fluoreszenzresonanz Energietransfer) ausgenutzt: An den Enden der Sonde befinden sich Fluoreszenzfarbstoffe. Am 5'-Ende sitzt das Fluorophor, der Reporter, am 3'-Ende der Quencher. Die Stärke der Fluoreszenz ist abhängig von der Entfernung zwischen Reporter und Quencher. Solange die Sonde intakt ist, also Reporter und Quencher räumlich nahe zusammen liegen, wird das Fluoreszenzsignal des Reporters durch den Quencher unterdrückt. Je weiter Fluorophor und Quencher sich von einander entfernen, desto höher ist die zu messende Fluoreszenz. Der Reaktionsansatz enthält neben cDNA auch Primer und eine Taq-Polymerase. Das aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnene Enzym ist thermostabil und besitzt 5'-3'-Exonukleaseaktivität. Bindet die TaqMan-Sonde nun an ihrem komplementären Strang der in der PCR amplifizierten cDNA, wird sie gleichzeitig durch die mit der Taq-Polymerase assoziierte doppelstrangspezifische Nukleaseaktivität hydrolysiert. Dadurch werden Fluorophor und Quencher räumlich getrennt und das Fluoreszenzsignal steigt. Für die RT-PCR-Ansätze wurde mit folgenden Sonden gearbeitet:

Toll-like-Rezeptor 2 (*TLR2*)

Toll-like-Rezeptor 5 (*TLR5*)

Toll-like-Rezeptor 6 (*TLR6*)

Toll-like-Rezeptor 9 (*TLR9*)

Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*)

Jede Sonde wurde in einem dreifachen Ansatz untersucht. *GAPDH* wurde als interne Kontrolle eingesetzt, da es als sogenanntes *housekeeping*-Gene für ein Enzym der Glykolyse kodiert, das die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat katalysiert und somit in allen Zellen vorkommt. Wurde hier bei der jeweiligen cDNA ein Fluoreszenzsignal detektiert, wurde davon ausgegangen, dass das Umschreiben von RNA in cDNA erfolgreich verlaufen ist.

In einem zweiten RT-PCR-Ansatz wurden mit Hilfe der folgenden Sonden die cDNA-Sequenzen charakterisiert:

BAX

CDKN1A (p21^{WAF1})

CDKN2A (p16^{INK4A})

GAPDH

Alle Sonden sind mit dem Farbstoff FAM (Fluorescein) markiert.

Die cDNA wurde 1:2 mit Aqua dest. verdünnt. Auf eine 96-Well Mikrotiterplatte für RT-PCR wurden 2,5 µl cDNA gegeben, hinzu kamen noch der Mastermix (6,25 µl), die entsprechende Sonde (0,625 µl) und 3,125 µl Wasser. Für jede Sonde wurde eine *no template control* (NTC, Kontrolle ohne cDNA), also eine Negativkontrolle, mitgeführt. Die PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

- | | |
|---------------------------|---------------------|
| 1. 95°C für 10 min | } 50 Wiederholungen |
| 2. 95°C für 15 sec | |
| 3. 60°C für 1 min | |
| 4. Messung der Absorption | |
| 5. 60 °C für ∞ min | |

3.3 Statistik

Von allen Experimenten wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt. Alle Werte sind als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Für die statistische Auswertung wurde bei normal verteilten Werten der Students-t-Test und bei nicht normal verteilten Werten der U-Test nach Mann und Whitney verwendet. Es wurden die p-Werte zwischen Kontroll- und Behandlungsansätzen ermittelt. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SigmaPlot.

4 Ergebnisse

4.1 Rezeptorexpression der Tumorzellen

Die Verteilung der EGF und Her2/neu Rezeptoren auf den einzelnen Tumorzelllinien wurde durchflusszytometrisch analysiert.

Pankreaskarzinomzellen

Die Zelllinie T3M4 exprimiert sowohl den EGF (92,0 %), als auch den Her2/neu Rezeptor (87,2 %) sehr stark. Demgegenüber sind beide Rezeptoren nur auf 20 % der MIA PaCa-2 Zellen nachweisbar. Bei der Zelllinie BxPC-3 wurde nahezu keine Expression der Rezeptoren detektiert (0,4 % EGFR; 1,1 % Her2/neu) (Abb. 6).

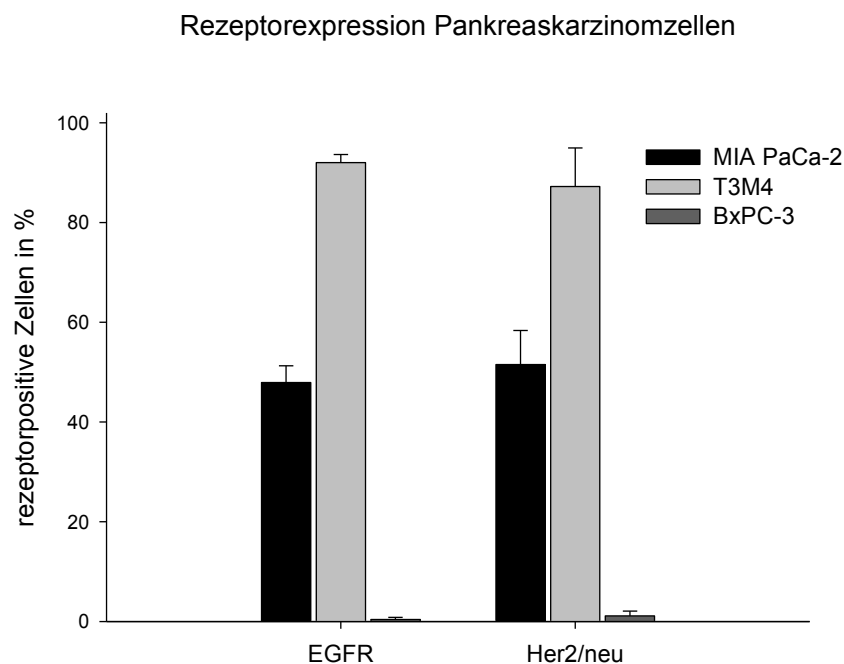


Abb. 6: Darstellung der EGFR und Her-2/neu Expression auf Pankreaskarzinomzellen. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen.

Kolonkarzinomzellen

HCT116 Zellen exprimieren beide Rezeptortypen stark (92,3 % EGFR⁺; 86,6 % Her2/neu⁺). Bei den HROC18 Zellen ist der Her2/neu auf der Zelloberfläche stärker exprimiert als der EGFR. Ein inverses Expressionsprofil wurde für HROC60 mit 95,3 % EGFR⁺ Zellen erhoben (Abb. 7).

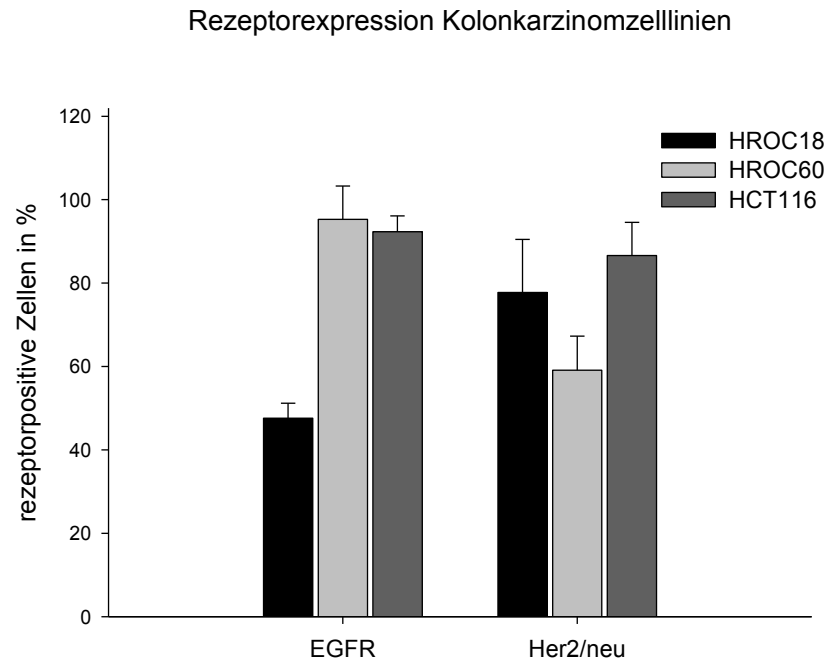


Abb. 7: Darstellung der EGFR und Her-2/neu Expression auf Kolonkarzinomzellen. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen.

4.2 Internalisierung avitaler *S. pyogenes* in Zielzellen

4.2.1 Bakterielle Inaktivierung durch Druck

In einem ersten Ansatz sollte zunächst die Internalisierung avitaler Streptokokken in die humanen Karzinomzellen des Pankreas und des Kolons untersucht werden. Es wurde der *S. pyogenes* Serotyp M49 *wt* verwendet. Die Bakterien wurden durch Hochdruck (400 MPa, 30 min) inaktiviert. Anschließend wurden die Bakterien mit dem Farbstoff CFDA-SE gefärbt. Über eine Analyse mit Hilfe des FACS konnte nun festgestellt werden, ob und wie viel % der Tumorzellen Bakterien enthalten. Außerdem konnte durch die Kombination der Bakterien mit Trastuzumab und Panitumumab der Einfluss der Antikörper auf die Internalisierungsrate untersucht werden.

Pankreaskarzinomzellen

Die Zelllinien MIA PaCa-2 und BxPC-3 zeigen sowohl nach 2 h, als auch nach 24 h Inkubationszeit statistisch signifikante Internalisierungsraten. Die Zelllinie T3M4 zeigt nach 2 h Inkubationszeit einen statistisch signifikant erhöhten Anteil von Tumorzellen mit intrazellulären Bakterien, nach 24 h nur bei Behandlung mit HDI Bakterien in Kombination mit Panitumumab. Es erwies sich, dass durch Druck inaktivierte Bakterien bereits nach zwei h in hohem Maße intrazellulär in den Pankreaskarzinomzelllinien zu detektieren sind (Abb. 8).

Kolonkarzinomzellen

Bei den KRK-Linien HROC18, HROC60 und HCT116 waren die Ergebnisse heterogener. Nach zwei Stunden war die stärkste Internalisierung von Bakterien in die Zielzellen bei HCT116 zu verzeichnen. Hier waren bis zu 67,5 % der Streptokokken intrazellulär {vs. Kombination 73,3 % (Trastuzumab) und 71,3 % (Panitumumab)}. Bei der Zelllinie HROC18 zeigten sich nach zwei h deutlich geringere Werte (7,4 % *S. pyogenes*; 7,7 % *S. pyogenes* + Trastuzumab; 6,6 % *S. pyogenes* + Panitumumab), die sich allerdings nach 24 h deutlich erhöhten (58,5 % *S. pyogenes*; 43,6 % *S. pyogenes* + Trastuzumab; 46,8 % *S. pyogenes* + Panitumumab). Zumeist fanden sich signifikante Ergebnisse (Abb. 9).

4.2.2 Bakterielle Inaktivierung durch Ethanol

Dieser Versuch wurde mit *S. pyogenes* durchgeführt, die zuvor für 30 min mit 40 %igem Ethanol bei 20 °C behandelt wurden.

Die Internalisierungsraten waren zeitabhängig. Während nach zwei h im Vergleich zu den Daten mit druckinaktivierten Bakterien noch sehr wenig Bakterien intrazellulär zu finden waren, stieg dieser Anteil nach 24 h deutlich an. Es fanden sich zumeist signifikante Internalisierungsraten. Die Ergebnisse waren vergleichbar mit den Ergebnissen, die für die druckinaktivierten Bakterien erhoben wurden.

Pankreaskarzinomzellen

Bei der Zelllinie T3M4 wurden nach zwei h nahezu keine Bakterien intrazellulär detektiert. Demgegenüber waren nach 24 h in über 70 % der Zellen Bakterien zu finden. Vergleichbare Werte wurden bei den Kombinationsansätzen beobachtet (T3M4, zwei h: 2,0 % *S. pyogenes* + Trastuzumab; 1,9 % *S. pyogenes* + Panitumumab). Nach 24 h fanden sich deutlich mehr intrazelluläre Bakterien (T3M4, 24 h: 74,4 % *S. pyogenes* + Trastuzumab; 71,8 % *S. pyogenes* + Panitumumab) (Abb. 8).

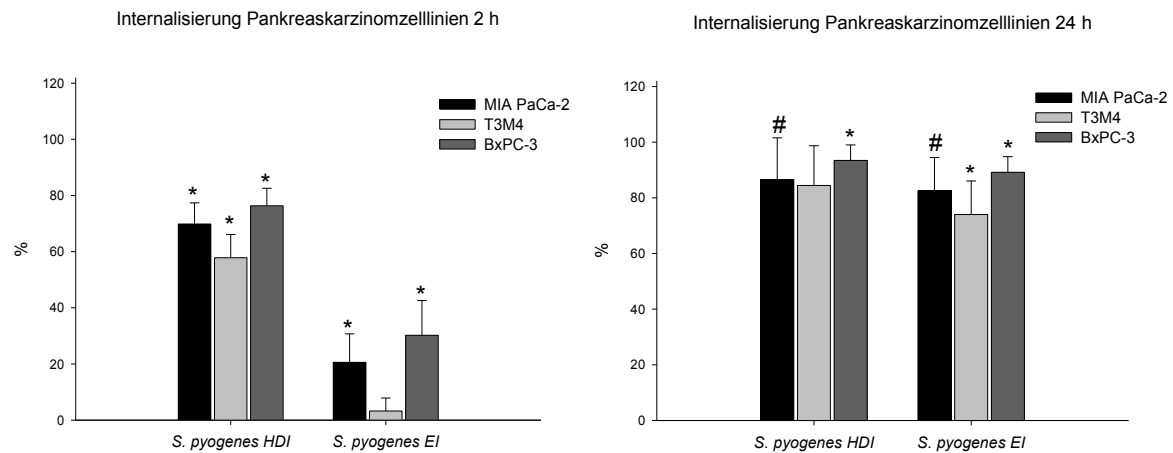


Abb. 8: Darstellung des Anteils an Pankreaskarzinomzellen mit intrazellulären HDI bzw. EI-*S. pyogenes* nach zwei und 24 h Inkubation. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$ (Werte normalverteilt); # $p < 0,05$ (Werte nicht normalverteilt).

Kolonkarzinomzellen

Die Internalisierungsrate der EI im Vergleich zu den HDI Bakterien war bei den KRK-Zelllinien insgesamt etwas geringer. Am stärksten war dieser Unterschied bei der Zelllinie HROC18 zu erkennen. Nach zwei h sind in 1,3 % der Zellen intrazelluläre Bakterien nachweisbar (HROC18, zwei h: 1,2 % *S. pyogenes* + Trastuzumab; 1,5 % *S. pyogenes* + Panitumumab). Nach 24 h fanden sich bei 7,2 % der HROC18 Zellen invasive Erreger (HROC18, 24 h: 6,0 % *S. pyogenes* + Trastuzumab; 7,2 % *S. pyogenes* + Panitumumab). Der größte Anteil an Zellen mit intrazellulären Bakterien wurde bei der Zelllinie HCT116 detektiert. Hier waren 7,3 % nach zwei h und 75,2 % nach 24 h der Tumorzellen mit intrazellulären *S. pyogenes* gesehen worden (HCT116, zwei h: 4,6 % *S. pyogenes* + Trastuzumab, 5,9 % *S. pyogenes* + Pabutumumab; 24 h: 73,4 % *S. pyogenes* + Trastuzumab, 80,6 % *S. pyogenes* + Pabutumumab) (Abb. 9).

Da, wie oben beschrieben, die Internalisierungsraten nur in geringem Maße durch die Kombination mit Trastuzumab oder mit Panitumumab beeinflusst wurden, wurde in den grafischen Darstellungen zu Gunsten der Übersichtlichkeit auf diese Werte verzichtet.

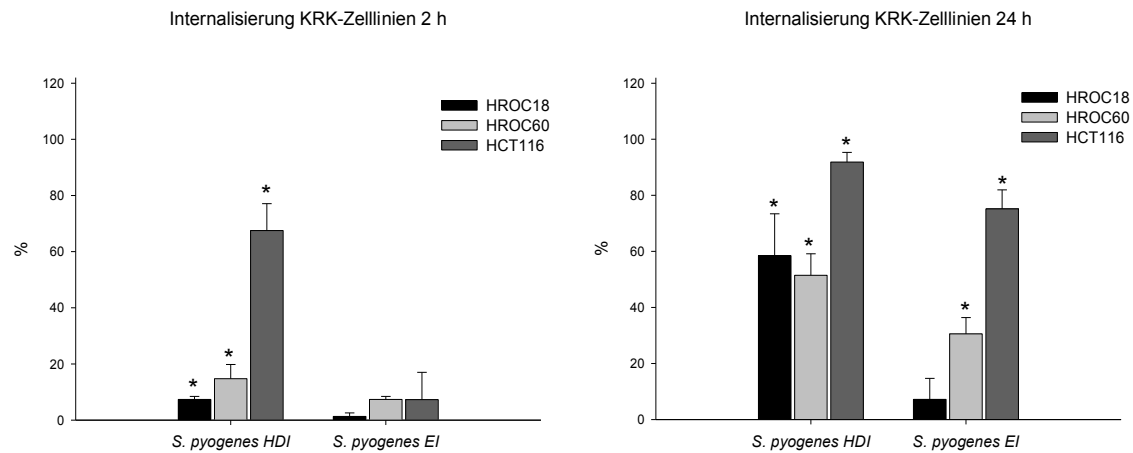


Abb. 9: Darstellung des Anteils an KRC-Zellen mit intrazellulären HDI bzw. EI *S. pyogenes* nach zwei und 24 h Inkubation. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$ (Werte normalverteilt).

Zusammenfassung

Nach 24 h Inkubationszeit finden sich bei einem Großteil der Tumorzellen intrazellulär Bakterien. Der Einfluss der Konjugation der Streptokokken mit einem mAk auf die Internalisierungsraten ist gering bis nicht vorhanden.

4.3 WST-1 Assay

Ausgehend von den Voruntersuchungen zur Internalisierung von *S. pyogenes* und deren Antikörper-Konjugaten wurde nachfolgend analysiert, ob die Behandlung mit den therapeutischen Komponenten wachstumshemmende bzw. -fördernde Wirkung auf die Tumorzellen hat. Hierzu wurde zunächst die metabolische Aktivität der Tumorzellen mit Hilfe des WST-1 Assays gemessen.

4.3.1 Bakterielle Inaktivierung durch Druck

Pankreaskarzinomzellen

Die Monotherapie von *S. pyogenes* führte bei MIA PaCa-2 zu einer Reduktion des Anteils an metabolisch aktiven Zellen auf 77,3 % nach 24 h, nach 48 Stunden auf 76,6 %. Die Monotherapie mit Trastuzumab bzw. Panitumumab führte nach 24 h zu einer fast 20 %-igen Minderung der metabolischen Aktivität (MIA PaCa-2, 24 h: 85 % Trastuzumab; 83 % Panitumumab metabolisch aktive Zellen). Dieser Effekt war jedoch nach 48 h bei der Monotherapie nahezu aufgehoben (MIA PaCa-2, 48 h: 93,1 % Trastuzumab; 99,8 % Panitumumab metabolisch aktive Zellen). Mit der *S. pyogenes*-Monotherapie vergleichbare Effekte waren bei der Kombinationstherapie mit den mAk zu beobachten. (Abb. 10). Bei den Zelllinien BxPC-3 und T3M4 zeigten sich geringere Effekte, bei denen oftmals die

Behandlungsdauer den Therapieerfolg wenig beeinflusst hat, beziehungsweise die positiven Effekte reversibel nach 48 h Inkubationszeit waren (Daten nicht gezeigt).

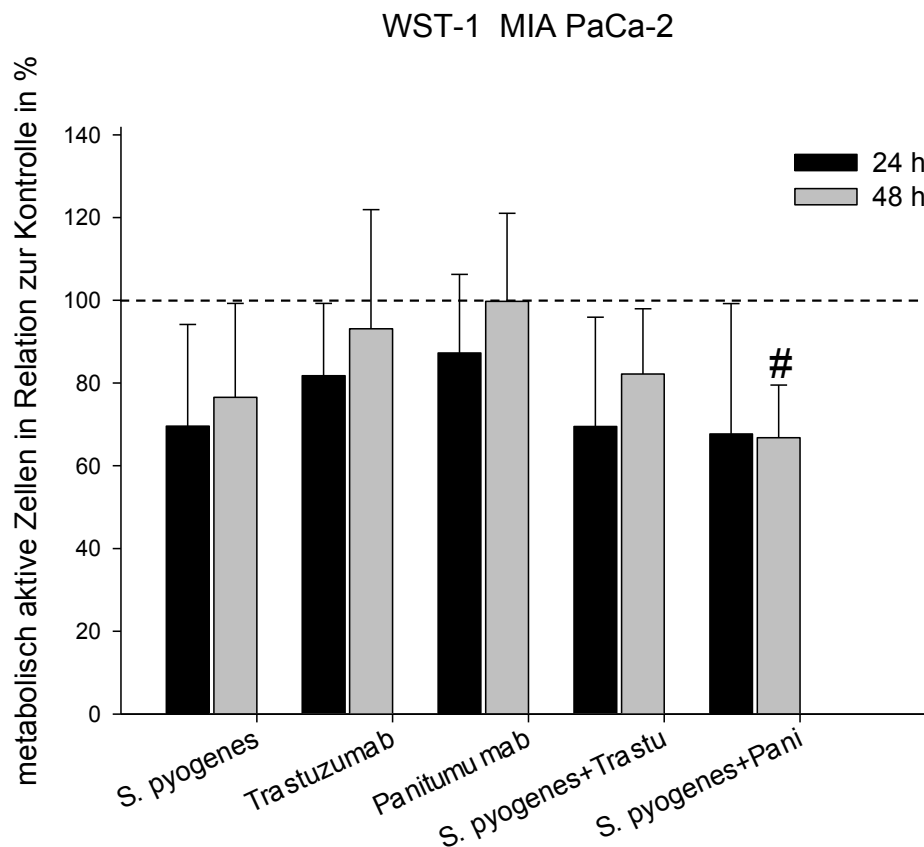


Abb. 10: Darstellung der metabolischen Aktivität der Pankreaskarzinomzelllinie MIA PaCa-2 nach 24 und 48 h Behandlung mit HDI *S. pyogenes* in Relation zur Kontrolle. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt und bei der Auswertung zu 100 % gesetzt. Die Zellen wurden sowohl mit *S. pyogenes* und den mAk, als auch mit beiden Kombinationen (Bakterien + mAk) koinkubiert. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. # $p < 0,05$ (Werte nicht normalverteilt).

Kolonkarzinomzellen

Die Behandlung mit *S. pyogenes* führte bei der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 zu einer Minderung der metabolischen Aktivität nach 24 h um ca. 13 %. Die mAk-Monotherapie führte nach 24 h zu einer erhöhten metabolischen Aktivität. Nach 48 h Inkubationszeit waren zumeist mehr Zellen mit einem intakten mitochondrialen Succinat-Tetrazolium Dehydrogenase System zu detektieren. Die Resultate der Kombinationsbehandlung mit Trastuzumab oder Panitumumab zeigte Werte, die mit der *S. pyogenes*-Monotherapie vergleichbar sind (Abb. 11). Die Behandlung mit *S. pyogenes* und Panitumumab führte bei der KRK-Zelllinie HROC18 insbesondere nach 48 h zu einer deutlichen Minderung der metabolischen Aktivität. Der Anteil sank signifikant auf 65,1 %. Im Gegensatz dazu waren die therapeutischen Effekte bei HROC60 am geringsten. Hier erzielte mit einer Senkung der

metabolischen Aktivität um 10 % die Kombination aus *S. pyogenes* und Panitumumab den größten therapeutischen Erfolg (Daten nicht gezeigt).

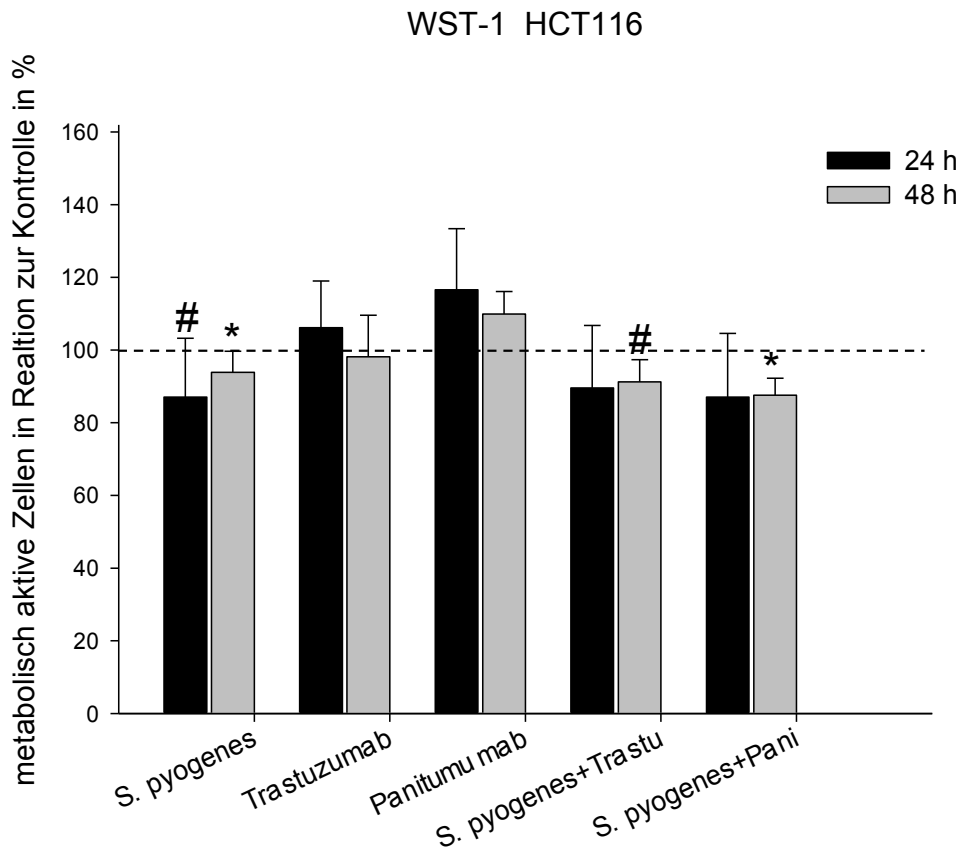


Abb. 11: Darstellung der metabolischen Aktivität der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 nach 24 und 48 h Behandlung mit HDI *S. pyogenes* in Relation zur Kontrolle. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt und bei der Auswertung zu 100 % gesetzt. Die Zellen wurden sowohl mit *S. pyogenes* und den mAk, als auch mit beiden Kombinationen (Bakterien + mAk) koinkubiert. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$ (Werte normalverteilt); # $p < 0,05$ (Werte nicht normalverteilt).

4.3.2 Bakterielle Inaktivierung durch Ethanol

In weiterführenden Analysen wurde der Einfluss EI Bakterien auf den Anteil an Zellen mit einem intakten mitochondrialen Succinat-Tetrazolium Dehydrogenase System untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl die Bakterien, als auch die jeweilige Konjugate mit den mAk zelllinien- und zeitabhängig einen deutlichen Einfluss auf die metabolische Aktivität der Zellen haben. Diese Effekte wurden insbesondere nach 48 h Inkubation detektiert.

Pankreaskarzinomzellen

Eine signifikante Abnahme der metabolischen Aktivität um bis zu 40 % war bei der Zelllinie MIA PaCa-2 nach 24 h Behandlung mit *S. pyogenes* zu verzeichnen. Bei längerer Behandlungsdauer fanden sich weniger deutliche Ergebnisse, sodass nach 72 h eine Minderung der metabolischen Aktivität von 19 % zu finden war. Die mAk-Monotherapien

zeigten eine Minderung der Zellen mit einem intakten mitochondrialen Succinat-Tetrazolium Dehydrogenase System, jedoch weniger stark als bei Therapie mit *S. pyogenes*. Die Kombination aus *S. pyogenes* und Trastuzumab erbrachte mit mehr als 50 % Minderung der metabolischen Aktivität die deutlichsten Ergebnisse (Abb. 12). Vergleichbare Befunde wurden auch für die anderen Pankreaskarzinomzelllinien erhoben (Daten nicht gezeigt).

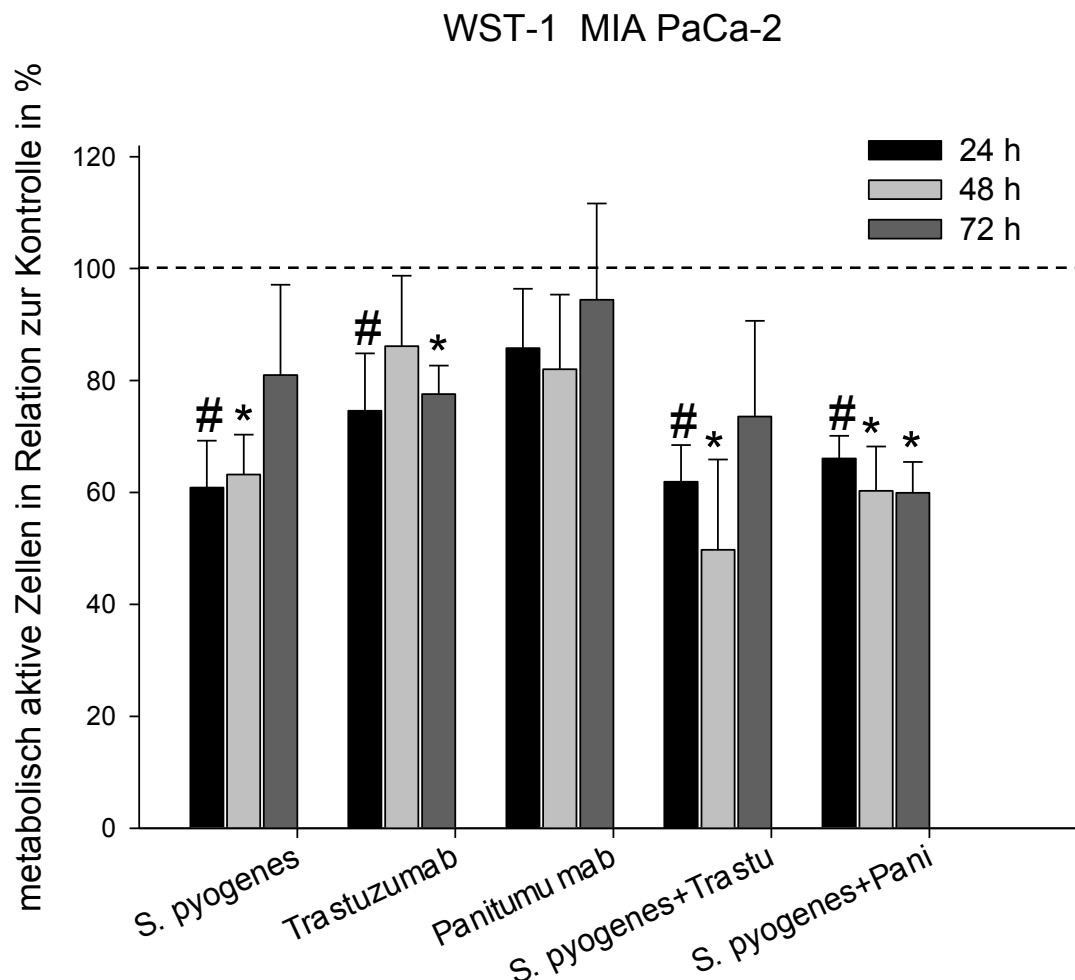


Abb. 12: Darstellung der metabolischen Aktivität der Pankreaskarzinomzelllinie MIA PaCa-2 nach 24, 48 und 72 h Behandlung mit EI *S. pyogenes* in Relation zur Kontrolle. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt und bei der Auswertung zu 100 % gesetzt. Die Zellen wurden sowohl mit *S. pyogenes* und den mAk, als auch mit beiden Kombinationen (Bakterien + mAk) kokubiert. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$ (Werte normalverteilt); # $p < 0,05$ (Werte nicht normalverteilt).

Kolonkarzinomzellen

Es zeigte sich, dass die Bakterien allein, sowie deren Antikörper-Konjugate einen Einfluss auf die metabolische Aktivität der Kolonkarzinomzellen haben. Deren Empfindlichkeit gegenüber der Therapie war geringer als die der Pankreaskarzinomzellen. Die deutlichste Abnahme der metabolischen Aktivität war für die Zelllinien HCT116 nachweisbar. Hier sank der Wert bei der Therapie mit *S. pyogenes* signifikant um mehr als 25 % (75,6 %: 24 h; 68,4 %: 48 h; 73,6 %: 72 h). Eine mAk-Monotherapie senkte den Anteil metabolisch aktiver Zellen zu einem

geringen Prozentsatz. Den größten Erfolg zeigte die Kombination von *S. pyogenes* und Panitumumab mit statistisch signifikant gesenkten Werten auf 74,2 % (24 h) und 62,7 % (48 h) (Abb. 13). Die geringste Suszeptibilität gegenüber den therapeutischen Komponenten wurde - wie zuvor bereits bei den druckinaktivierten Bakterien - für die Zelllinie HROC60 beobachtet. Hier zeigten auch nach 48 h Inkubation fast 90 % der Zellen keine Beeinflussung in der metabolischen Aktivität (Daten nicht gezeigt).

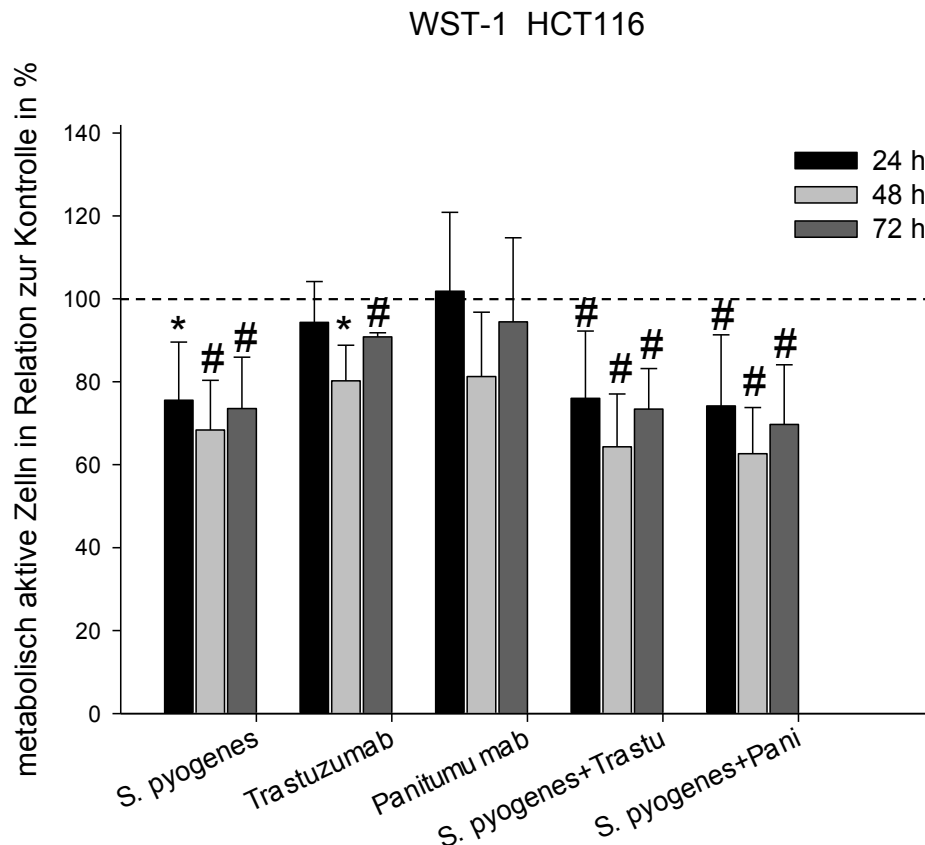


Abb. 13: Darstellung der metabolischen Aktivität der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 nach 24, 48 und 72 h Behandlung mit EI *S. pyogenes* in Relation zur Kontrolle. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt und bei der Auswertung zu 100 % gesetzt. Die Zellen wurden sowohl mit *S. pyogenes* und den mAk, als auch mit beiden Kombinationen (Bakterien + mAk) koinkubiert. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$ (Werte normalverteilt); # $p < 0,05$ (Werte nicht normalverteilt).

Zusammenfassung

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die bakterielle Monotherapie, als auch die Kombinationstherapie mit den Antikörpern bei allen Zelllinien zu einer Reduktion des Anteils metabolisch aktiver Zellen führt. Diese Aussage gilt sowohl für HDI, als auch für EI Bakterien. Die Monotherapie mit Trastuzumab oder Panitumumab vermittelte heterogene Effekte. Teilweise ließ sich auch damit die Zellzahl reduzieren, oftmals waren diese Effekte

nur transient zu beobachten, manchmal fand sich auch eine Stimulation der Tumorzellen mit einem erhöhten Anteil an metabolisch aktiven Zellen.

4.4 Calcein-AM Vitalitätsassay

Auf der Basis der zuvor erhobenen Daten wurde nun das zytotoxische Potenzial der einzelnen Komponenten gegenüber den Tumorzellen erfasst. Hierzu wurde eine Differenzierung zwischen vitalen und avitalen Zellen nach der therapeutischen Behandlung durchgeführt und mit der Färbung durch Calcein-AM verifiziert.

4.4.1 Bakterielle Inaktivierung durch Druck

Pankreaskarzinomzellen

Nach 24 h Behandlung mit *S. pyogenes* waren 90,5 % der MIA PaCa-2 Tumorzellen vital, nach 48 h noch 87,8 %. Die Verringerung der Zellzahl war statistisch signifikant. Aber auch die mAk-Monotherapie erbrachte eine Verringerung des Anteils vitaler Zellen, bei Trastuzumab nach 48 h um 14 %. Bei der Kombinationstherapie ist Panitumumab der den größten Erfolg vermittelnde Kombinationspartner (Abb. 14). Bei der Zelllinie T3M4 konnte nach 48 h mit 3,2 % nach Behandlung mit *S. pyogenes* eine marginale Zunahme an toten Zellen nachgewiesen werden. Ein ebenfalls anderes Bild wurde für die BxPC-3 Zellen beobachtet, bei denen zytotoxische Effekte der *S. pyogenes* Monotherapie ausschließlich transient zu beobachten waren (5,5 % nach 24 h Behandlungsdauer) (Daten nicht gezeigt).

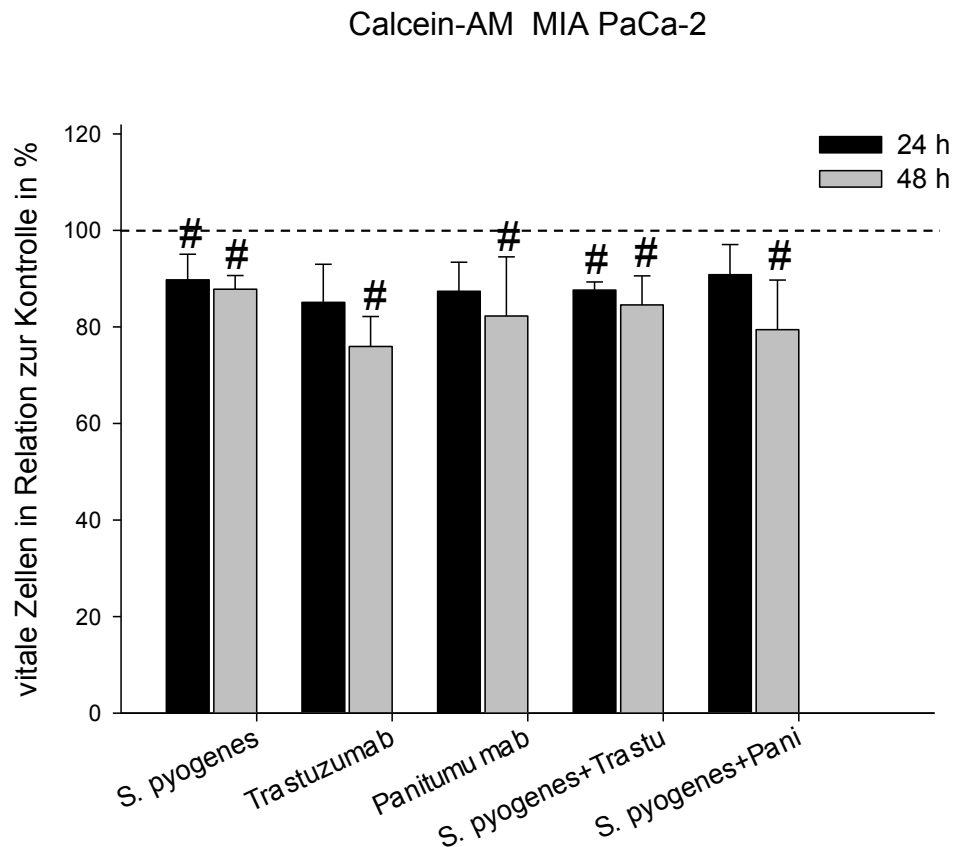


Abb. 14: Darstellung des Anteils vitaler Pankreaskarzinomzellen der Zelllinie MIA PaCa-2 nach 24 und 48 h Behandlung mit HDI *S. pyogenes* in Relation zur Kontrolle. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt und bei der Auswertung zu 100 % gesetzt. Die Zellen wurden sowohl mit *S. pyogenes* und den mAk, als auch mit beiden Kombinationen (Bakterien + mAk) koinkubiert. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. # $p < 0,05$ (Werte nicht normalverteilt).

Kolonkarzinomzellen

Bei den KRK-Linien senkte sich durch eine *S. pyogenes*-Monotherapie bei den HROC60 nach 24 h der Anteil avitaler Zellen um 1,7 %, nach 48 h um 12,3 %. Auch die mAk-Monotherapie führte in einem geringen Maß zu einer Senkung des Anteils vitaler Zellen. Die Kombinationstherapie von Streptokokken und Trastuzumab erbrachte nach 24 h eine Reduktion um 2,1 %, nach 48 Stunden waren > 20 % avitale Zellen nachweisbar (Abb. 15). Ähnliche, jedoch weniger stark ausgeprägte Effekte hatte die Therapie auf die Zelllinie HCT116. Bei den HROC18 Zellen führte die Behandlung hingegen weder nach 24 h, noch nach 48 h zu einer Zellschädigung. Darüber hinaus zeigte auch die alleinige Behandlung mit den Antikörpern, wie bereits zuvor im Rahmen der Proliferationsuntersuchungen beobachtet, keine zellschädigende Wirkung (Daten nicht gezeigt).

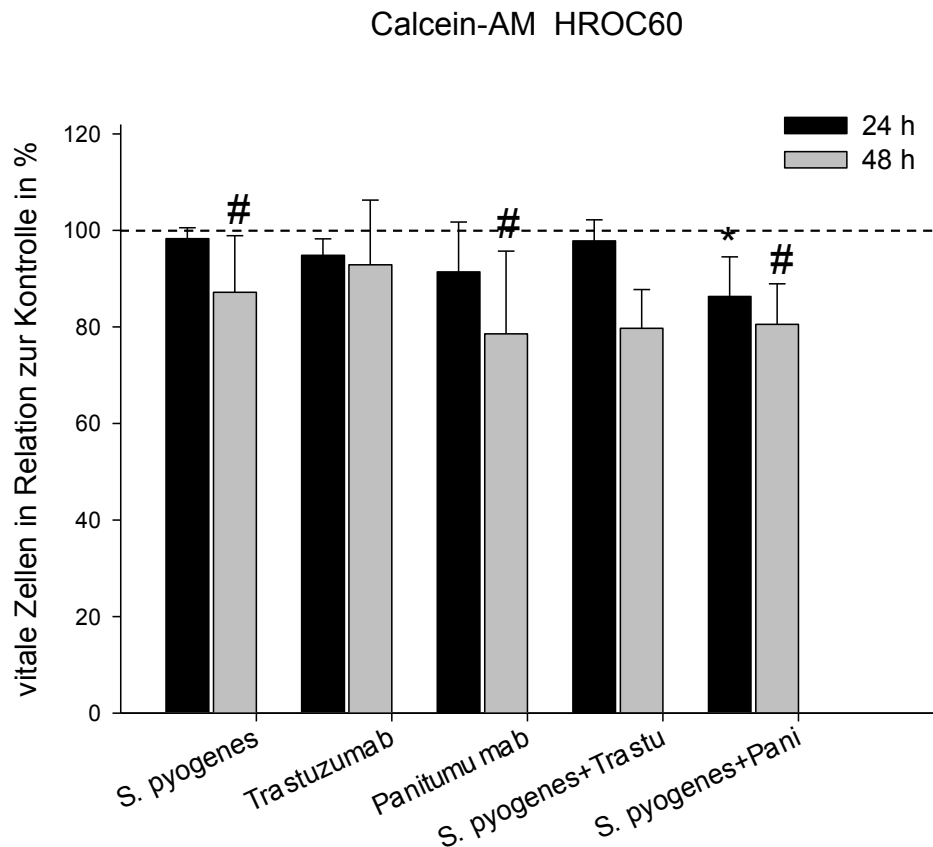


Abb. 15: Darstellung des Anteils vitaler Kolonkarzinomzellen der Zelllinie HROC60 nach 24 und 48 h Behandlung mit HDI *S. pyogenes* in Relation zur Kontrolle. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt und bei der Auswertung zu 100 % gesetzt. Die Zellen wurden sowohl mit *S. pyogenes* und den mAk, als auch mit beiden Kombinationen (Bakterien + mAk) kokultiviert. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$ (Werte normalverteilt); # $p < 0,05$ (Werte nicht normalverteilt).

4.4.2 Bakterielle Inaktivierung durch Ethanol

Pankreaskarzinomzellen

Bei der Zelllinie MIA PaCa-2 zeigten sich zunächst antitumorale Effekte bei der Monotherapie mit *S. pyogenes*. Diese waren nach längerer Behandlungsdauer jedoch wieder rückläufig. Ähnlich verhielt es sich mit der mAk-Monotherapie, hier fand sich nach 72 h sogar eine Wachstumsstimulation (Trastuzumab: 128,8%). Die Ergebnisse der Kombinationstherapie sind vergleichbar mit denen der Streptokokkenmonotherapie (Abb. 16). Eine Zunahme an toten Zellen wurde besonders durch die alleinige Behandlung mit den Streptokokken bei der Zelllinie T3M4 hervorgerufen. Dieser Effekt war nach 48 h am deutlichsten ausgeprägt. Die mAk-Monotherapie erbrachte zum Teil eine Stimulation der Tumorzellen (Trastuzumab: 105,0 % vitale Zellen nach 48 h Inkubationszeit). Antitumorale Resultate fanden sich in der Kombinationstherapie (Abb. 17). Demgegenüber wurden bei der Zelllinie BxPC-3 nur wenige avitale Zellen nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

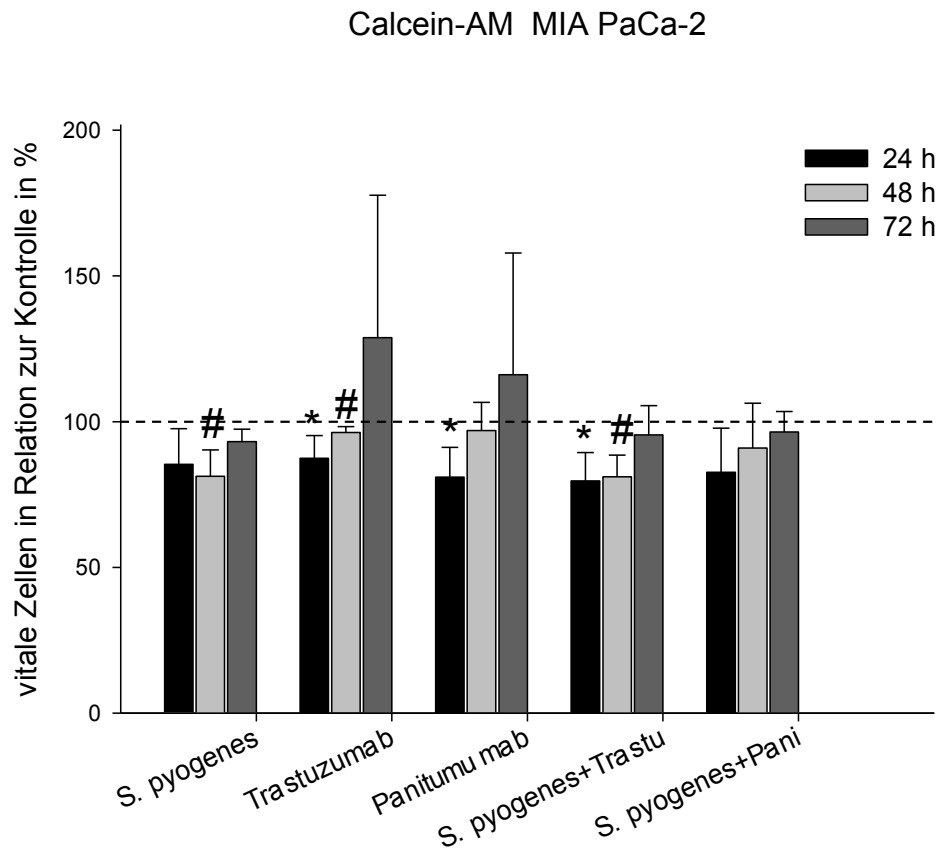


Abb. 16: Darstellung des Anteils vitaler Pankreaskarzinomzellen der Zelllinie MIA PaCa-2 nach 24, 48 und 72 h Behandlung mit EI *S. pyogenes* in Relation zur Kontrolle (unbehandelte Zellen zu 100 % gesetzt). Die Zellen wurden sowohl mit *S. pyogenes* und den mAk, als auch mit beiden Kombinationen (Bakterien + mAk) koinkubiert. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$ (Werte normalverteilt); # $p < 0,05$ (Werte nicht normalverteilt).

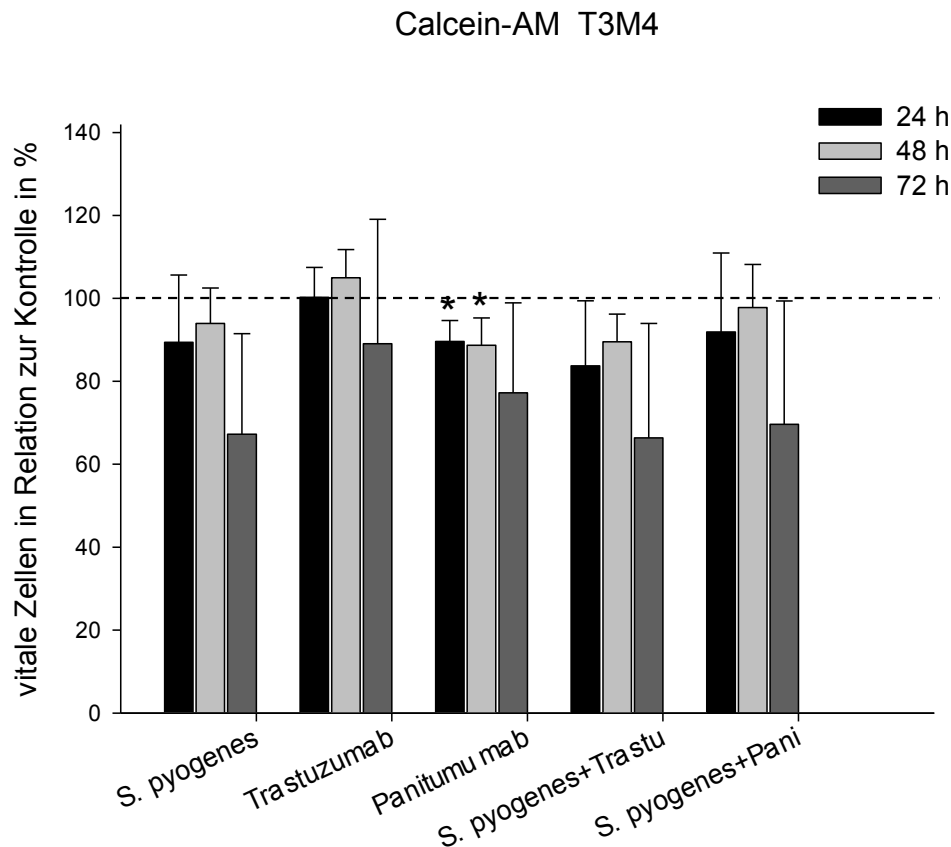


Abb. 17: Darstellung des Anteils vitaler Pankreaskarzinomzellen der Zelllinie T3M4 nach 24, 48 und 72 h Behandlung mit EI *S. pyogenes* in Relation zur Kontrolle (unbehandelte Zellen zu 100 % gesetzt). Die Zellen wurden sowohl mit *S. pyogenes* und den mAk, als auch mit beiden Kombinationen (Bakterien + mAk) koinkubiert. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$ (Werte normalverteilt).

Kolonkarzinomzellen

Bei der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 vermittelte die *S. pyogenes*-Monotherapie eine Reduktion der vitalen Zellen um 20 %. Die mAk-Monotherapieerfolge waren weniger stark ausgeprägt. Es erwies sich die Therapievariante bestehend aus Trastuzumab und avitalen *S. pyogenes* als die effektivste. Hier wurde eine zeitlich abhängige signifikante Reduktion der Zellzahl auf bis zu 64,9 % nach 72 h beobachtet (Abb. 18). Bei den anderen beiden KRK-Linien wurden geringere antitumorale, zum Teil transiente Effekte nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

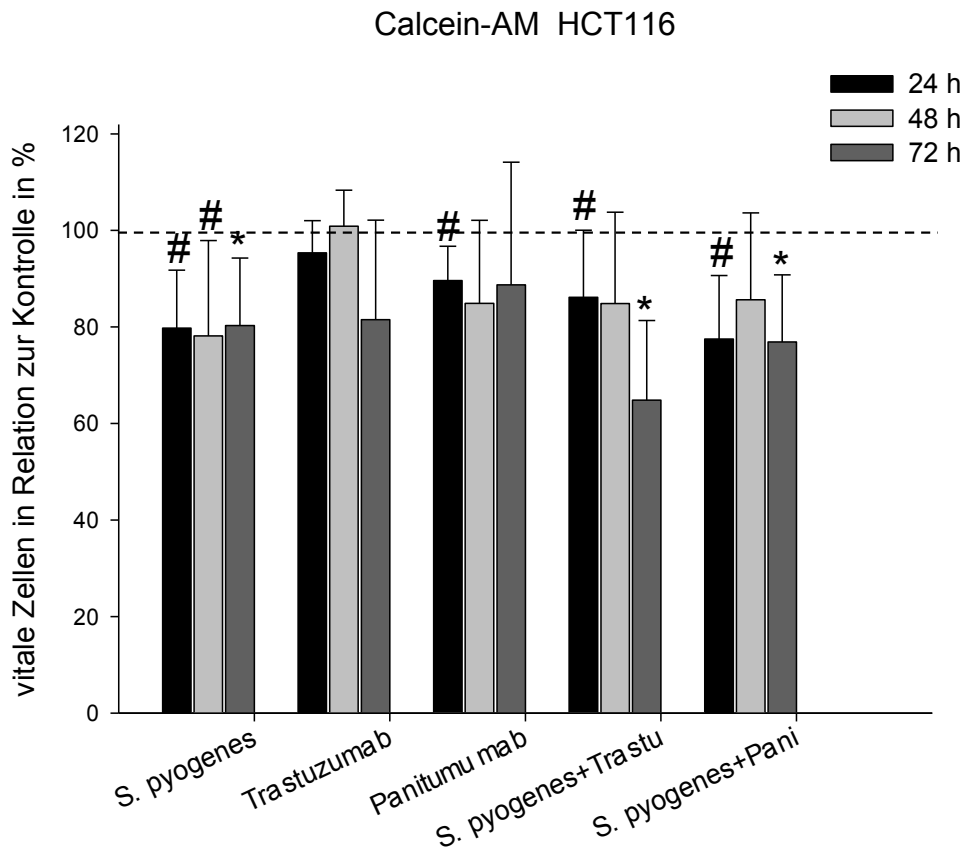


Abb. 18: Darstellung des Anteils vitaler Kolonkarzinomzellen der Zelllinie HCT116 nach 24, 48 und 72 h Behandlung mit EI *S. pyogenes* in Relation zur Kontrolle (unbehandelte Zellen zu 100 % gesetzt). Die Zellen wurden sowohl mit *S. pyogenes* und den mAk, als auch mit beiden Kombinationen (Bakterien + mAk) koinkubiert. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$ (Werte normalverteilt); # $p < 0,05$ (Werte nicht normalverteilt).

Zusammenfassung

Die Monotherapie mit HDI *S. pyogenes* sowie die Kombination mit Antikörpern führte zu einer Reduktion des Anteils lebender Zellen. Eine längere Dauer der Anwendung führte zelllinienabhängig zu einer deutlicheren Zellschädigung.

Die Untersuchungen zeigten, dass die eingesetzten EI Bakterien eine Verringerung des Anteils vitaler Zellen induzierten, die zytotoxische Aktivität war jedoch weitestgehend unabhängig von der Konjugation an die Antikörper. Es zeigten sich auch hier zelllinienspezifische Unterschiede.

Ausgehend von diesen Voruntersuchungen, in denen gezeigt wurde, dass die Art der bakteriellen Inaktivierung einen Einfluss auf deren Zytotoxizität hat, wurden alle nachfolgenden Analysen ausschließlich mit EI Streptokokken durchgeführt.

4.5 Zellzyklusanalyse

Die Wirkung von *S. pyogenes* und der mAk auf den Zellzyklus wurde durch die Analyse des DNA Gehaltes der Karzinomzellen untersucht. Eine Zelle weist in den einzelnen Zellzyklusabschnitten einen spezifischen DNA Gehalt auf, den man, nach Anfärben mit dem DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff PI, durchflusszytometrisch bestimmen kann (Abb. 19). Die quantitative Auswertung erfolgte mit dem Programm Mod Fit.

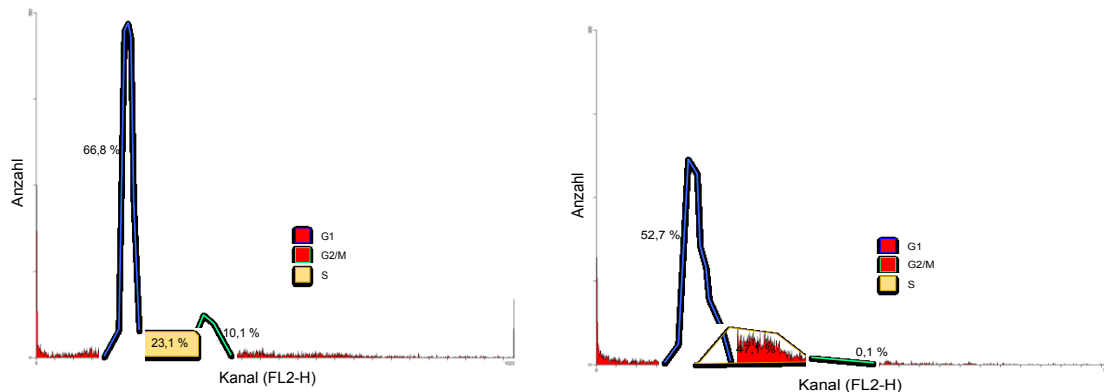


Abb. 19: Repräsentative Histogramme der T3M4 Zellen zum Zeitpunkt 48 h. Im Histogramm links ist die Verteilung der Zyklusphasen der unbehandelten Zellen und rechts nach der Koinkubation mit *S. pyogenes* und Trastuzumab dargestellt. Die Zellen zeigen nach der Behandlung eine Verschiebung der Zellzyklusphasen mit deutlichem Anstieg des S-Peak und Abnahme des G2/M-Peak (Auswertung mittels ModFit LTTM-Software).

Pankreaskarzinomzellen

MIA PaCa-2 Zellen wurden durch *S. pyogenes* dahingehend beeinflusst, dass ihr Anteil in der G0/G1-Phase und in der G2/M-Phase sank. Dafür stieg der Anteil der Zellen in der S-Phase. Die mAk-Monotherapie ließ die Verteilung der Zellen im Zellzyklus nahezu unverändert. Die Kombinationstherapien zeigten mit der *S. pyogenes*-Monotherapie vergleichbare Ergebnisse (Abb. 20). Am stärksten ausgeprägt waren die Effekte bei der Zelllinie T3M4 und führten zu einer signifikanten Verringerung des Anteils der Zellen in der G0/G1- und in der G2/M-Phase. Nach 48 h waren sowohl bei der bakteriellen Monotherapie, als auch in den mAk-Kombinationstherapien nahezu keine Zellen in der G2/M-Phase detektierbar. Diese Verringerung ging mit einem Anstieg in der S-Phase einher. Die mAk-Monotherapie beeinflusste den Zellzyklus der Tumorzellen nicht (Abb. 21). Ähnliche Tendenzen waren auch bei der Zelllinie BxPC-3 nachzuweisen, allerdings weniger stark ausgeprägt (Daten nicht gezeigt).

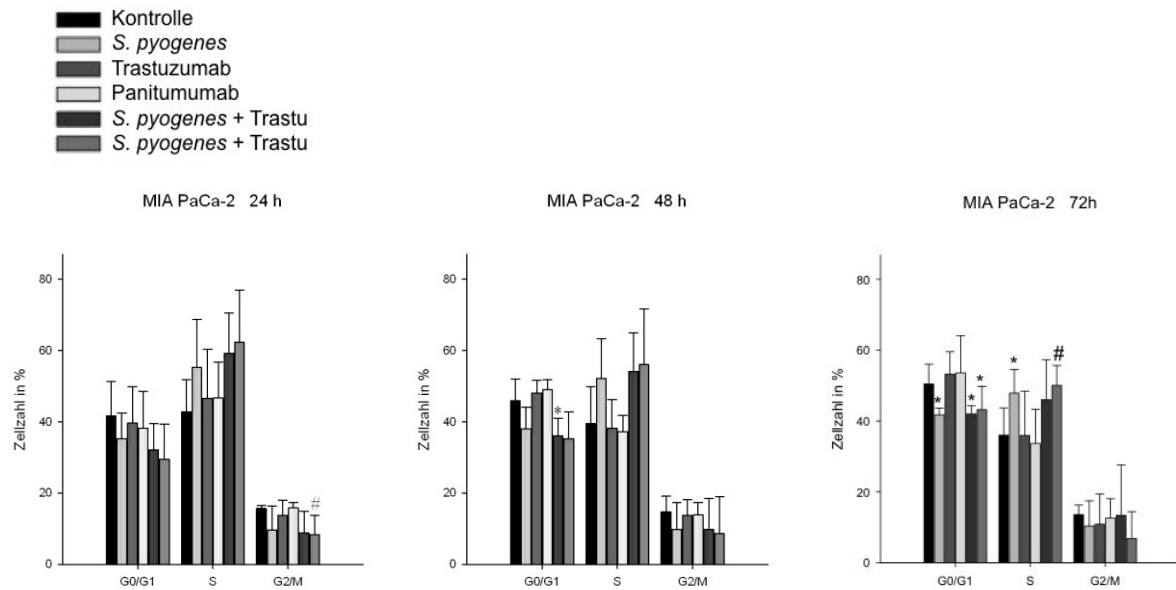


Abb. 20: Darstellung der Zellzyklusverteilung der Zelllinie MIA PaCa-2 nach 24, 48 und 72 h Behandlung mit EI *S. pyogenes*. Die Zellen wurden mit *S. pyogenes*, den mAk und den Kombinationen behandelt. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$ (Werte normalverteilt); # $p < 0,05$ (Werte nicht normalverteilt).

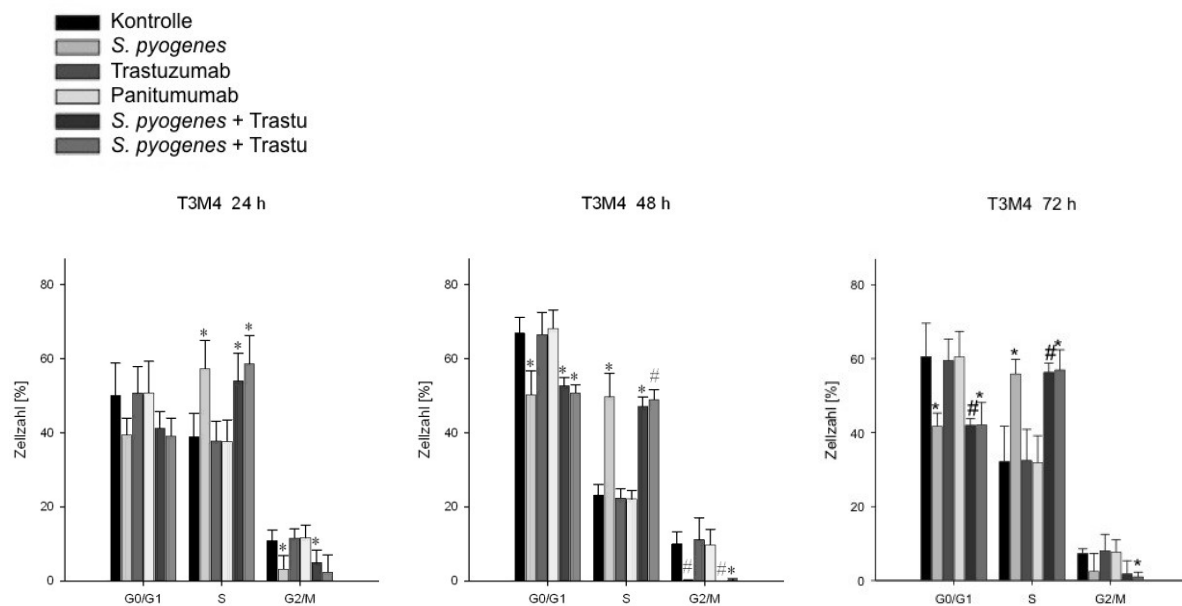


Abb. 21: Darstellung der Zellzyklusverteilung der Zelllinie T3M4 nach 24, 48 und 72 h Behandlung mit EI *S. pyogenes*. Die Zellen wurden mit *S. pyogenes*, den mAk und den Kombinationen behandelt. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$ (Werte normalverteilt); # $p < 0,05$ (Werte nicht normalverteilt).

Kolonkarzinomzellen

Ähnlich wie zuvor bereits bei den Pankreaskarzinomzellen beobachtet, führte auch die Behandlung der HCT116 Zellen zu einer deutlich Verschiebung der Zellzyklusphasen. *S. pyogenes* vermittelte eine signifikante Zunahme der Zellen in der S-Phase und eine Abnahme in der G2/M-Phase. Auch hier waren die deutlichsten Effekte nach 48 h erkennbar (Abb. 22).

Bei den weiteren Tumorzelllinien (HROC18, HROC60) konnte, unabhängig von der Behandlung, kein eindeutiger Einfluss auf den Zellzyklus nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

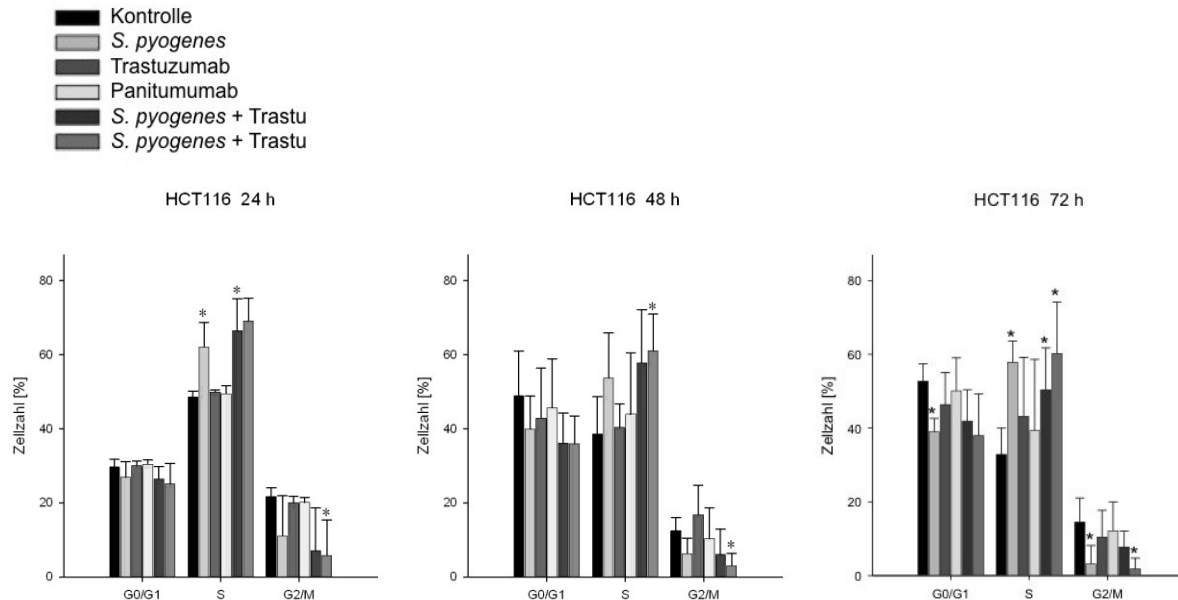


Abb. 22: Darstellung der Zellzyklusverteilung der Zelllinie HCT116 nach 24, 48 und 72 h Behandlung mit EI *S. pyogenes*. Die Zellen wurden mit *S. pyogenes*, den mAk und den Kombinationen behandelt. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$ (Werte normalverteilt); # $p < 0,05$ (Werte nicht normalverteilt).

Zusammenfassung

Insgesamt zeigten insbesondere die mit Bakterien behandelten Zellen, mit und ohne Antikörperkonjugation, eine Veränderung in der Zellzyklusverteilung. Diese Zellen waren zu einem geringen Anteil in der G0/G1- und in der G2/M-Phase und zu einem erhöhten Anteil in der S-Phase vertreten.

4.6 Apoptosenachweis

Neben der quantitativen Analyse der Zellzyklusphasen erlaubt die Durchflusszytometrie auch eine Beurteilung des Anteils apoptotischer Zellen. Diese erscheinen aufgrund des verminderten DNA Gehaltes im so genannten SubG1-Peak.

Die Untersuchungen dieser Arbeit ergaben, dass nahezu keine Apoptose in den Tumorzellen induziert wurde, denn ein Anstieg der Zellen im SubG1-Peak wurde weder bei den pankreatischen, noch den kolorektalen Tumorzellen nachgewiesen. Auch hatte die Dauer der Kultivierung wenig Einfluss auf die Apoptoserate (Daten nicht gezeigt).

4.7 RNA Analyse

Um die zuvor beschriebenen Effekte auch auf molekularer Ebene zu verstehen, wurde die Expression von BAX, p16^{INK4A} und p21^{WAF1} quantitativ mittels RT-PCR untersucht. Das BAX Protein ist ein Initiator der Apoptose, die Proteine p16^{INK4A} und p21^{WAF1} regulieren den Zellzyklus. Aufgrund der Heterogenität der ermittelten Ergebnisse wird nachfolgend ausschließlich auf die Daten eingegangen, welche für die Zelllinie HCT116 erhoben wurden.

Während die Behandlung mit *S. pyogenes* keinen deutlichen Einfluss auf die Translation von BAX-RNA hat, steigt der relative Anteil im Vergleich zur Kontrolle (=100%) nach Monotherapie mit den Antikörpern auf 236,7 % (Trastuzumab) beziehungsweise auf 342,6 % (Panitumumab).

Die RNA des Zellzyklusregulators p16^{INK4A} weist nach 24 h im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bei allen Tumorzellen quantitativ erhöhte Werte auf. Auch hier induzierten die Antikörper die stärkste Zunahme. Nach 48 h hingegen ist kein einheitliches Expressionsmuster zu erkennen.

Ähnliches gilt für p21^{WAF1}, dessen quantitativer RNA-Gehalt nach 24 h Inkubation in allen behandelten Ansätzen erhöht ist.

Zusammenfassung

Die RNA Transkription des apoptoseinduzierenden Gens *BAX* ist unabhängig von der Art der therapeutischen Behandlung der Tumorzellen. Zumeist war der Einfluss der Therapeutika marginal. Es war kein Unterschied in der therapeutischen Behandlungsvariante in Hinblick auf die Quantität der RNA erkennbar.

Diskrepanzen ergaben sich für die Verteilung der Tumorzellen im Zellzyklus und der Daten für die RNA, aus der Zellzyklusregulatorproteine synthetisiert werden könnten. Eine Erhöhung des RNA-Anteils ist unabhängig von der Behandlungsart, in der Zellzyklusanalyse zeigten jedoch vorrangig mit Streptokokken behandelte Zellen Veränderungen.

Des Weiteren wiesen die Werte aus der quantitativen RT-PCR sehr große Standardabweichungen auf (Daten nicht gezeigt).

4.8 Quantifizierung der Tumorzellen nach Kokultur in der gemischten Lymphozytenkultur

In weiterführenden Analysen wurde untersucht, inwiefern die Anwesenheit immunkompetenter Zellen potentielle antitumorale Effekte beeinflusst. Diese Untersuchungen erfolgten in Kokultorexperimenten, in denen den therapeutischen Komponenten zusätzlich

PBMC zugesetzt wurden. Es wurden PBMC verschiedener, gesunder Spender in die Untersuchungen miteinbezogen. Die Quantifizierung der Zellen nach der Behandlung im Kokulturanatz erfolgte durchflusszytometrisch unter dem Einsatz von fluoreszierenden Beads (Fluoresbrite™ Microspheres YG).

Pankreaskarzinomzellen

Bei den MIA PaCa-2 Tumorzellen ergab sich ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Dauer und dem Erfolg der Therapie. Bei allen Ansätzen, die mit Streptokokken behandelt wurden, mit oder auch ohne Antikörperkombination, sank der Anteil an vitalen Tumorzellen nach 72 h signifikant auf 30 %. Bei der Antikörpermonotherapie waren entweder nur geringe Auswirkungen (Trastuzumab) oder sogar eine Wachstumsstimulation (Panitumumab) nachweisbar (Abb. 23). Ähnliche Daten wurden auch für die T3M4 Zellen erhoben. Hier zeigte die bakterielle Monotherapie nach 72 h eine signifikante Reduktion der Zellzahl auf 23,3 %. Bei den Zelllinien BxPC-3 waren die Ergebnisse weniger deutlich, aber dennoch statistisch signifikant bei Behandlung mit *S. pyogenes*. Außerdem kam es im Vergleich zu den 24 und 72 h Werten nach 48 h Inkubationszeit zu einer leichten Erhöhung der Tumorzellzahl (Daten nicht gezeigt).

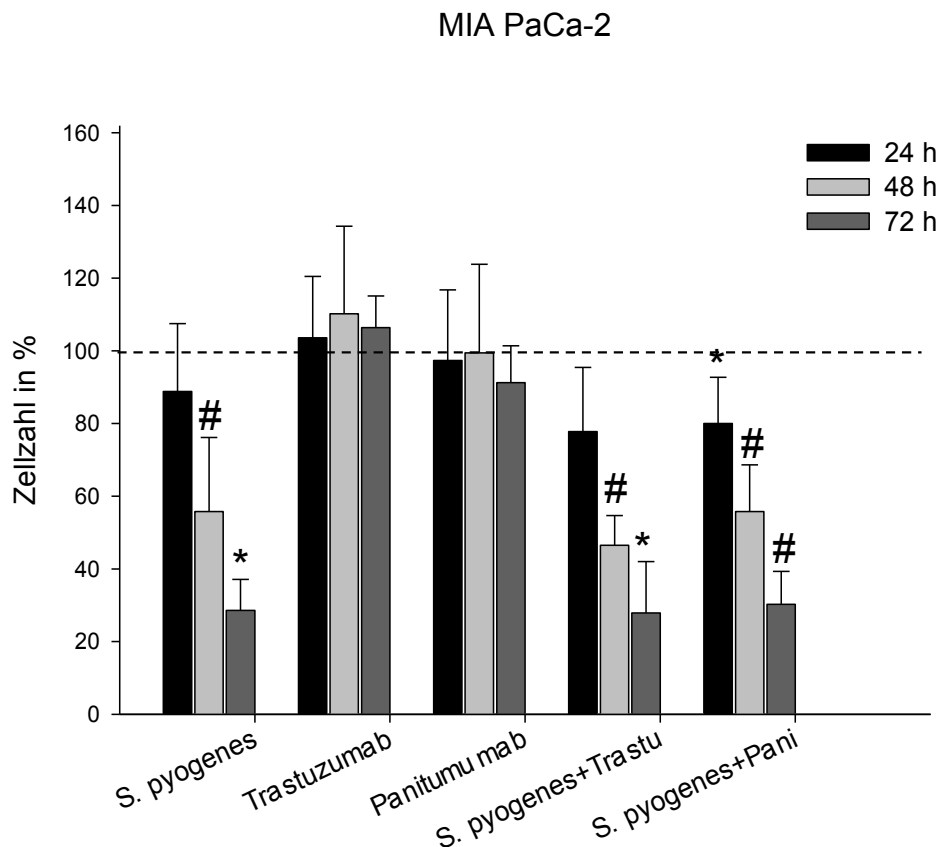


Abb. 23: Darstellung der quantitativen Analyse der vitalen Zellen der Zelllinie MIA PaCa-2 nach 24, 48 und 72 h Inkubationszeit mit *S. pyogenes*, Trastuzumab bzw. Panitumumab und den beiden Kombinationen von Bakterien und mAk in Relation zur Kontrolle. Zu jedem Ansatz wurden 1×10^6 PBMC hinzugefügt. Als Kontrolle dienten Tumorzellen, die nur mit PBMC inkubiert und bei der Auswertung zu 100 % gesetzt wurden. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$ (Werte normalverteilt); # $p < 0,05$ (Werte nicht normalverteilt).

Kolonkarzinomzellen

Die Kokultur mit *S. pyogenes* vermittelte eine hohe zytotoxische Aktivität gegenüber den HCT116 Zellen, die zu einer signifikanten Abnahme der Tumorzellzahl bis auf 11 % nach 72 h führte. Auch nach Zugabe von Trastuzumab senkte sich die Tumorzellzahl auf 65 % nach 72 h. Panitumumab hingegen führte nach 48 h sogar zu einer Wachstumsstimulation. In der Kombinationstherapie erbrachten *S. pyogenes* und Trastuzumab eine Reduktion der Zellzahl um 91 % nach 72 h. Ähnlich sind die Ergebnisse bei der Kombination von Bakterien mit Panitumumab (Abb. 24). Vergleichbare, jedoch weniger stark ausgeprägte Effekte wurden auch bei der Zelllinie HROC60 erzielt. Der Anteil von HROC18 Zellen war nach 72 h ebenfalls eindeutig reduziert (*S. pyogenes*: 18,9 %; *S. pyogenes* + Trastuzumab: 12,4 %; *S. pyogenes* + Panitumumab: 19,6 % vitale Tumorzellen; Daten nicht gezeigt).

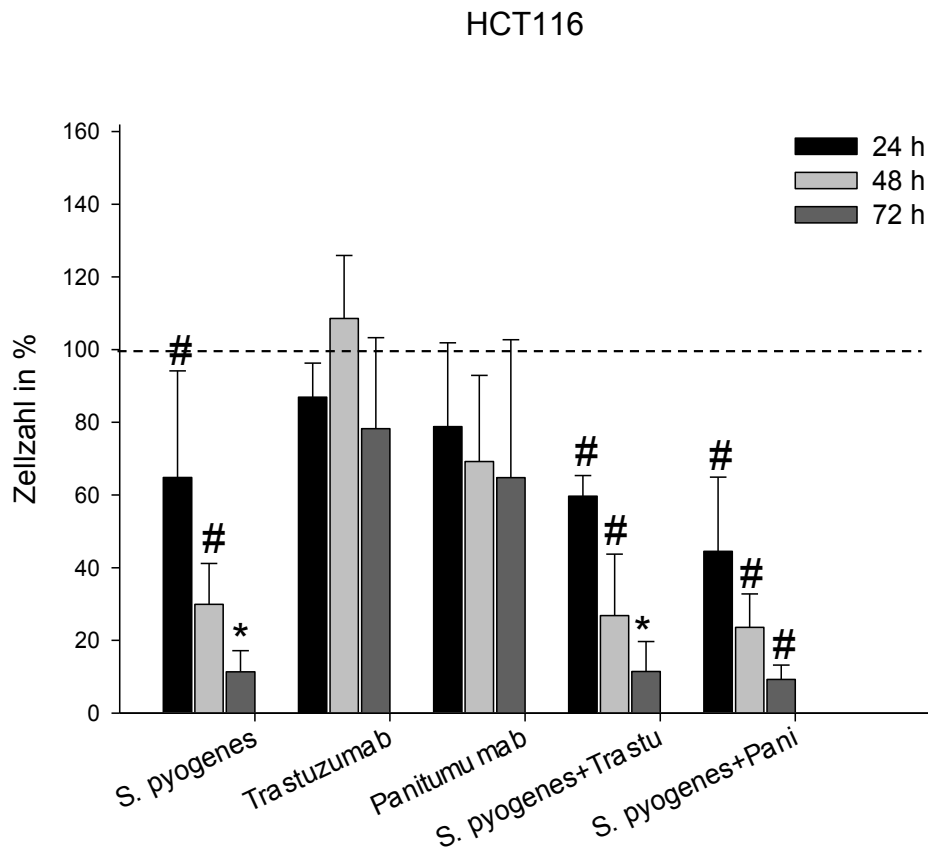


Abb. 24: Darstellung der quantitativen Analyse der vitalen Zellen der Zelllinie HCT116 nach 24, 48 und 72 h Inkubationszeit mit *S. pyogenes*, Trastuzumab bzw. Panitumumab und den beiden Kombinationen von Bakterien und mAk in Relation zur Kontrolle. Zu jedem Ansatz wurden 1×10^6 PBMC hinzugefügt. Als Kontrolle dienten Tumorzellen, die nur mit PBMC koinkubiert und bei der Auswertung zu 100 % gesetzt wurden. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$ (Werte normalverteilt); # $p < 0,05$ (Werte nicht normalverteilt).

Zusammenfassung

Nach der Inkubation im Kokulturanatz wurde eine eindeutige Reduktion der Tumorzellzahl bei allen Zelllinien beobachtet. Die zellschädigende Wirkung war dabei auch abhängig von den PBMC der verschiedenen Spender. Darüber hinaus wurden ebenfalls innerhalb der einzelnen Zelllinien und zwischen den einzelnen Zeitpunkten Differenzen beobachtet. Eine eindeutig stärkere therapeutische Effizienz der Konjugate im Vergleich zu den Bakterien allein konnte in Analogie zu den anderen Befunden im Rahmen dieser Untersuchung ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

5 Diskussion

5.1 Immuntherapie gastrointestinaler Karzinome

Trotz moderner Diagnostik und Therapiemöglichkeiten sind das Pankreas- und das Kolonkarzinom auch heute noch Erkrankungen mit ungünstiger Prognose. Jährlich sterben 11/100.000 Einwohner an den Folgen eines Pankreaskarzinoms und 20/100.000 Einwohner durch das KRK (Robert Koch Institut, 2010).

Das Pankreaskarzinom wird durch Operation und adjuvante Chemotherapie mit Gemcitabin behandelt; zur palliativen Therapie steht Gemcitabin als Monotherapie zur Verfügung. Einen kurativen Ansatz für Patienten mit KRK stellt die Resektion des tumortragenden Darmabschnitts dar, gegebenenfalls wird eine adjuvante Chemotherapie ergänzt. Unter diesen Therapien kommt es jedoch oftmals nur zu unzureichenden Überlebensraten, sodass nach weiteren effektiven Behandlungsoptionen, die dabei möglichst nebenwirkungsarm sind, gesucht werden muss.

Einen viel versprechenden Ansatz bietet dabei die Immuntherapie. Sie aktiviert das körpereigene Immunsystem, sodass Tumorzellen irreversibel geschädigt und in der Folge eliminiert werden. Es ist bereits bekannt, dass sich die meisten Tumoren während ihrer Entwicklung mit dem Immunsystem auseinandersetzen und dass sich tumorantigenspezifische Effektorzellen (vor allem B- und T-Lymphozyten) bilden (Milleck J, 1984). Auch die Beobachtung, dass Immundefizite mit einer erhöhten Tumorzinzidenz einhergehen, deutet auf die Interaktionen zwischen Immunsystem und Tumorentstehung hin (Orentas RJ *et al.*, 2008). Tumorzellen entwickeln Strategien, um sich dem Immunsystem zu entziehen. Zu diesen *Immune-Escape*-Mechanismen (Mechanismen zum Entgehen des Immunsystems) gehört zum Beispiel die Herunterregulation oder das völlige Fehlen von MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche, sodass diese Zellen nicht von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden können. Ein weiterer Grund ist die fehlende Expression der Moleküle CD80 und CD86, die als Kofaktoren zur T-Zellaktivierung notwendigen sind. Ohne eine Kostimulation führt die Präsentation eines Peptids über den MHC/T-Zellrezeptor-Komplex zur T-Zell-Anergie und somit zur immunologischen Toleranz. Außerdem können Tumorzellen immunsuppressive Substanzen, wie IL-10 und den *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β, transformierender Wachstumsfaktor β) synthetisieren (Burmester GR, Pezuzutto A, 1998a). Die Resistenz gegenüber der Apoptose (u.a. durch Herunterregulation von Fas auf der Tumorzelloberfläche) ist ein weiterer wichtiger Mechanismus im Tumorprogress (Zitvogel L *et al.*, 2008).

Die Idee, Tumoren mit einem immuntherapeutischen Ansatz zu begegnen, ist schon über 120 Jahre alt. 1891 beobachtete William B. Coley, dass primär inoperable Sarkompatienten von einer Behandlung mit avitalen *S. pyogenes* und *S. marcescens*, dem sogenannten Coley's Toxin, profitierten (Staib L *et al.*, 1999). Die Immuntherapie kann in mehrere Gruppen eingeteilt werden. Zunächst kann unterschieden werden, ob das Immunsystem des Patienten durch Tumorstoffe oder Präsentation von Tumorstoffen durch dendritische Zellen stimuliert wird oder ob Antikörper, die spezifisch gegen Tumorgewebe gerichtet sind, das Immunsystem anregen. Die in dieser Arbeit angewandte Therapie zielt auf die Zugabe von mAk und avitalen Bakterien ab und stellt somit eine Kombination von aktiv-unspezifischer und passiv-spezifischer Immuntherapie dar. Bei der aktiv-unspezifischen Immuntherapie steht die Aktivierung unspezifischer Effektorzellen, wie Makrophagen, Granulozyten und Natürlicher Killerzellen durch avitale mikrobielle Strukturen im Vordergrund. Die Bakterien führen dabei zu einer massiven Stimulation der Immunzellen, welche daraufhin – neben der direkten Eliminierung von Tumorzellen durch Sekretion zytotoxischer Moleküle – auch spezifische Immunantworten initiieren können. Die aktiv-unspezifische Immuntherapie mit Bakterien findet gegenwärtig beim Urothelkarzinom der Blase klinische Anwendung. Die intravesikale Instillation von BCG, einem attenuierten *Mycobacterium bovis* Stamm, soll die Rezidivbildung des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms verhindern (Porena M *et al.*, 2010). Weitere mikrobiell basierte Ansätze haben derzeit rein experimentellen Stellenwert. Demgegenüber haben sich Behandlungsstrategien, die zur Klasse der passiven Immuntherapie gehören, bereits in der Klinik etabliert. Der Wirkungsmechanismus dieser Ansätze beruht auf der Wirkung der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC). Dabei kommt es in Gegenwart von Monozyten oder Makrophagen zu einer Aktivierung der Immunzellen mit anschließender Zerstörung der antikörperbindenden Tumorzellen (Löhr JM *et al.*, 2003f) (Abb. 25).

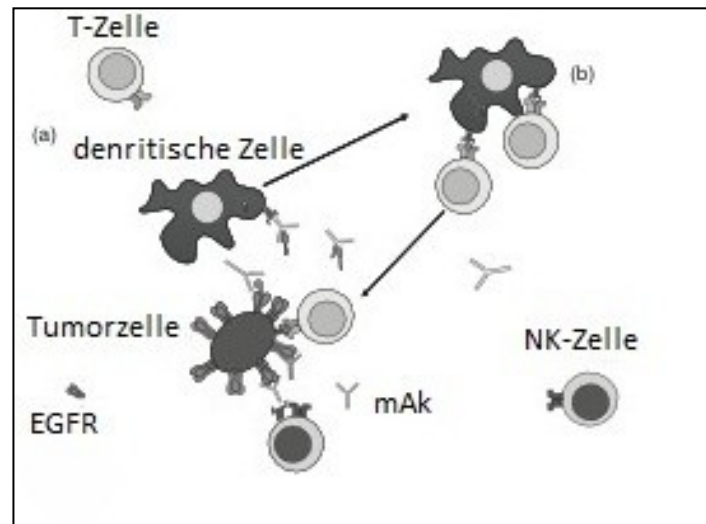


Abb. 25: Effekte von mAk auf das Immunsystem.

- (a) Die mAk binden den EGFR, der auf der Zelloberfläche von Tumorzellen exprimiert wird. NK-Zellen binden gleichzeitig über den Fc-Rezeptor an den mAk. Diese Interaktion führt zur ADCC. Weiterhin führt die Bindung von mAk und EGFR über Trogozytose zur Internalisierung eines Teils des EGFR von antigenpräsentierenden Zellen. Auch T-Zellen können über die Fab(Fragment antigen binding)-Region der mAk aktiviert werden.
 - (b) Die dendritischen Zellen präsentieren Teile des internalisierten EGFR den T-Zellen. So wird eine Immunantwort initiiert, die sich gegen den EGFR in Zusammenhang mit dem MHC-Komplex der Tumorzellen richtet.
- (modifiziert nach: Martinelli E *et al.*, 2009)

Die passive Immuntherapie mittels mAk verfügt bereits über ein großes Anwendungsgebiet. Vollhumane bzw. vollhumanisierte Antikörper wie beispielsweise Herceptin[®], Cetuximab[®] oder Avastin[®] werden erfolgreich in der Standardtherapie von Tumorerkrankungen eingesetzt. Der Vorteil solcher vollhumanen Antikörper besteht in der guten Verträglichkeit, die hauptsächlich darauf beruht, dass nahezu keine körpereigene Abwehr gegen diese „Fremdantikörper“ existiert. Die therapeutische Relevanz konnte bislang insbesondere für das niedrig maligne Non-Hodgkin-Lymphom, das mit dem anti-CD20-Ak Rituximab behandelt wird, sowie für Her-2/neu positive Mammakarzinome, die mittels Trastuzumab therapiert werden, bestätigt werden. Für die Kombination von Trastuzumab mit einer Chemotherapie beim Mammakarzinom konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass sich signifikant sowohl die Responderrate erhöht, die Zeitspanne bis zur weiteren Tumorprogression verlängert und die mittlere Überlebenszeit der Patienten steigt (Lantz E *et al.*, 2010).

Beim Pankreaskarzinom sind diese beiden immuntherapeutischen Ansätze noch in der präklinischen bzw. klinischen Studienphase. Beispielsweise wurde der murine Antikörper 17-1A in klinischen Studien getestet. Er ist gegen das Antigen Co 17-1A, ein Membranglykoprotein mit einem Molekulargewicht von 37 kD, gerichtet. Allerdings erwies sich der Einsatz als wenig Erfolg versprechend, da bereits nach kurzer Behandlungsdauer

humane anti-Maus-Antikörper-Antworten nachweisbar waren (Löhr JM *et al.*, 2003f). Weitere immuntherapeutische Strategien, wie z. B. Bevacizumab, ein monoklonaler Antikörper, der durch selektive Bindung an VEGF die Ligandenbindung an den VEGF-Rezeptor inhibiert und somit die Angiogenese hemmt, ist in der Erstlinientherapie gegen metastasierte kolorektale Karzinome (in Kombination mit 5-Fluorouracil und Irinotecan) zugelassen. Beim Pankreaskarzinom zeigte sich nur eine limitierte therapeutische Effizienz (Aspinall-O'Dea M *et al.*, 2010). Bislang ist die Kombination mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib die erste Therapieform, die gegenüber der Standardmonotherapie mit Gemcitabin einen Überlebensvorteil für die Patienten erzielt. Erlotinib bindet intrazellulär selektiv an die Tyrosinkinase des EGFR und inhibiert die Phosphorylierung, sodass die Signalkaskade unterbrochen und das Zellwachstum gehemmt wird. In weiterführenden tierexperimentellen Therapiestudien mit humanen Pankreaskarzinomzellen, in denen humane Antikörper (u.a. Trastuzumab) getestet wurden, zeigte sich besonders der Effekt der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) als Hauptwirkmechanismus in der Tumorzellreduktion (Kimura K *et al.*, 2006). Insgesamt konnte jedoch im Vergleich zur Gemcitabin-Monotherapie bis dato nur ein geringer Überlebensvorteil und keine deutliche Verbesserung der Lebensqualität erzielt werden (Moore MJ *et al.*, 2007).

Demgegenüber ist die Prognose für Patienten mit einem KRK zwar besser, die 5-Jahres-Überlebensrate im UICC-Stadium IV liegt jedoch trotz neuerer Behandlungsmodalitäten zwischen 65 % und 5 % (Herold G *et al.*, 2012). Zusätzlich sind Therapiestrategien mit immuntherapeutischen Ansätzen auch beim Kolonkarzinom hauptsächlich noch in der experimentellen Studienphase. Unter anderem wurde gezeigt, dass Trastuzumab die Koloniebildung der Kolonkarzinomzelllinie HCA-7 inhibiert und sich auch im Xenograft-Mausmodell mit HCA-7 Tumoren antitumorale Effekte durch Trastuzumab bemerkbar machten (Mann M *et al.*, 2001). Eine weitere Arbeitsgruppe konnte 2009 die dosisabhängige Reduktion der Zellzahl von CaCo-2 Zellen (KRK-Zellen) dokumentieren (Giannopoulou E *et al.*, 2009). Burden und Mitarbeiter nutzten den mAk Fsn0503 zur Inhibition von Cathepsin S. Die Antagonisierung dieser Cysteinprotease, die die Invasion endothelialer und Tumorzellen während des Tumorwachstums vermittelt, führte zu einem signifikant verminderten Tumorwachstum von HCT116 Zellen (Burden RE *et al.*, 2009). In einem weiteren immuntherapeutischen Ansatz konnten Yuk *et al.* interessante Ergebnisse zeigen. Die Kolonkarzinomzelllinie HCT116 reagierte nach Behandlung mit BCG/CWS (BCG/*cell wall skeleton*, Zellwandskelett) vermehrt strahlensensibel. Die Arbeitsgruppe erklärte diese Beobachtung mit der durch ROS (*reactive oxygen species*, reaktive Sauerstoffgruppen)

vermittelten Induktion von Autophagie, einem der Apoptose ähnlichem Zelltod (Yuk JM *et al.*, 2010).

Immuntherapeutische Strategien lassen auf ein vielversprechendes antitumorales Potenzial hoffen. Zum besseren Verständnis und somit zur Optimierung immuntherapeutischer Konzepte sollten weitere Studien erfolgen. In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirksamkeit einer kombinierten Immuntherapie mit avitalen Bakterien und therapeutischen mAk untersucht werden. Die Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

5.2 Vergleich der eigenen Ergebnisse mit der Literatur

5.2.1 Bakterien und Inaktivierungsvarianten

Für alle Untersuchungen wurde das Bakterium *S. pyogenes* Serotyp M49 *wt* eingesetzt. Dieser Stamm wurde aus mehreren Gründen ausgewählt. Die antitumorale Wirkung von *S. pyogenes* wurde bereits durch Coley beschrieben, der vor mehr als einem Jahrhundert Streptokokken therapeutisch bei Tumorpatienten einsetzte (Patyar S *et al.*, 2010). Auf Grund vorhergehender Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe wurde *S. pyogenes* ausgewählt, denn es konnte im Mausmodell eine signifikante Reduktion der Tumormasse von Pankreastumoren, in die vitale *S. pyogenes* injiziert wurden, aufgezeigt werden (Maletzki C *et al.*, 2008). Untermuert wurden die Ergebnisse bei der Injektion von *S. pyogenes* Lysaten in murine Pankreastumoren (Linnebacher M *et al.*, 2008). Auch hier kam es zu einer Tumorregression. Weiterführende Analysen ergaben, dass die Therapieeffekte unter anderem auf eine Aktivierung des Immunsystems zurückzuführen sind. Bei beiden Therapieschemata wurde ein massiver, transients Anstieg an Granulozyten, Monozyten und NK-Zellen im peripheren Blut und in der Milz detektiert, der mit einer systemischen Produktion von Th1-Zytokinen einherging. Parallel kam es zu einer deutlichen Zunahme an aktivierten T- und B-Zellen, welche direkte Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen verschiedener Entitäten aufwiesen (Maletzki C *et al.*, 2008; Linnebacher M *et al.*, 2008). Damit konnte das antitumorale Potenzial von Streptokokken erstmals seit Coley experimentell bestätigt werden. Da der Einsatz vitaler Bakterien v. a. aus ethischen Gründen klinisch nicht umsetzbar ist, mussten effektive Inaktivierungsverfahren evaluiert werden. Wesentliches Ziel dieser Arbeiten war, eine vollständige Inaktivierung der Bakterien zu erreichen, um ein unkontrolliertes Bakterienwachstum zu verhindern. Gleichzeitig sollte die antitumorale Wirksamkeit weitestgehend erhalten bleiben, um einen therapeutischen Effekt zu erzielen. Es wurde zur Inaktivierung so weit wie möglich auf den Einsatz chemischer Substanzen verzichtet, um

potenzielle zytostatische bzw. zytotoxische Effekte direkt auf die Bakterien zurückzuführen zu können. In der vorliegenden Arbeit wurden die Inaktivierungsverfahren Hochdruck und Ethanol eingesetzt. In Voruntersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe wurde die Praktikabilität und Funktionalität der Ethanolinaktivierung bestätigt (Stier S, 2009, unveröffentlicht). Die Inaktivierung mittels Hochdruck, die auch in der Lebensmittelindustrie zur Sterilisierung benutzt wird, stellt ab Drücken über 300 bis 600 MPa eine effektive Form der Inaktivierung für die meisten vegetativen Formen von Mikroorganismen dar (Gollwitzer H *et al.*, 2009).

5.2.2 Invasionsverhalten

Dass *S. pyogenes* von Karzinomzellen internalisiert wird, ist bereits mehrfach beschrieben (Kreikemeyer B *et al.*, 2004; Pollak B, 2009, unveröffentlichte Daten; Stier S, 2009, unveröffentlichte Daten) und konnte auch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Trotz einer Inaktivierung durch Druck oder Ethanol scheinen Adhärenz und Internalisation vermittelnde Faktoren funktionell erhalten zu sein. Eine Beeinflussung des bakteriellen Invasionsverhaltens durch die Konjugation mit den mAk wurde bei den untersuchten Zelllinien nur in sehr geringem Maße beobachtet und scheint zelllinienspezifisch zu sein.

5.2.3 mAk-Monotherapie

Zusammenfassend ist zur mAk-Monotherapie zu sagen, dass Panitumumab und Trastuzumab die Tumorzellen wenig beeinflussen. Eine signifikante Minderung der Vitalität oder der metabolischen Aktivität der Zellen konnte in den meisten Fällen nicht detektiert werden. Außerdem führte die Behandlung weder bei den Pankreaskarzinom- noch bei den KRK-Zelllinien zur Induktion von Apoptose. Darüber hinaus hatten die mAk keinen Einfluss auf die Verteilung der Zellzyklusphasen. Mögliche Ursachen sollen im Folgenden diskutiert werden.

5.2.3.1 Einfluss der EGFR- & HER2/neu-Expression auf das Therapieansprechen

In einer ersten Untersuchung wurde die Verteilung von EGFR und Her2/neu auf den Tumorzellen nachgewiesen. Die Rezeptorverteilung ist nachfolgend tabellarisch dargestellt (Tab. 2, siehe S. 65).

Tab. 2: Anteil der Tumorzellen mit EGFR und Her2/neu auf der Zelloberfläche

Zelllinie	EGFR	Her2/neu
MIA PaCa-2	+	+
BxPC-3	-	-
T3M4	+++	+++
HROC18	++	+++
HROC60	+++	++
HCT116	+++	+++

-	0-20%
+	21-40%
++	41-60%
+++	61-100%

Die Zelllinien zeigten ein heterogenes Expressionsmuster des EGFR. Die Pankreaskarzinomzellen zeichneten sich insgesamt durch eine geringere Rezeptorexpression aus als die KRK-Linien. Bei der Zelllinie BxPC-3 konnte kein EGFR nachgewiesen werden, was im Widerspruch zu Daten aus der Literatur steht (Pino MS *et al.*, 2006). Es ist jedoch auch bekannt, dass Tumorzellen sich im Laufe der Kultivierung sowohl morphologisch, als auch molekulopathologisch verändern (Gagos S *et al.*, 1996). Entsprechend ist ein Verlust der Rezeptorexpression infolge der Langzeitkultur nicht auszuschließen.

Es stellte sich die Frage, in welchem Zusammenhang die Verteilung der Rezeptoren und das Ansprechen auf die mAk stehen. Zu erwarten wäre ein Therapieeffekt des mAk direkt proportional zur Expressionsrate des korrespondierenden Rezeptors. Es wurde jedoch die stärkste Suszeptibilität gegenüber Panitumumab bei der Zelllinie MIA PaCa-2 detektiert, welche, verglichen mit den Expressionsraten der anderen in dieser Arbeit untersuchten Karzinomzelllinien, nur wenige EGFR besitzt. Vergleichbare Beobachtungen wurden auch für die KRK-Linien gemacht. Interessanterweise korrelierte hier die Rezeptordichte invers mit dem Ansprechen auf die Therapie mit dem jeweiligen mAk. In der Literatur ist kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Rezeptorexpressionsrate und kurativem Effekt eines mAk des EGFR beschrieben (Larbouret C *et al.*, 2007; Al-Batran SE, Jäger E, 2007). Auch Kimura *et al.* berichteten 2006 in einer *in vitro* Analyse verschiedener Pankreaskarzinomzelllinien über eine fehlende Wachstumsbeeinflussung unter Trastuzumab Monotherapie. Sie untersuchten Zellen mit hohem, mittlerem und niedrigem HER2/neu Expressionslevel und fanden keine Korrelation zwischen Expressionsniveau und

Therapieerfolg (Kimura K *et al.*, 2006). Diese Aussagen können mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit untermauert werden, da prinzipiell keine Korrelation zwischen dem EGF Rezeptorstatus und dem Therapieerfolg mit Panitumumab nachweisbar war. Erklärungen für Mechanismen einer Resistenz gegenüber der monotherapeutischen Hemmung des EGF-Pathways könnten (1) in der Präsenz alternativer Signalwege liegen, (2) in einer Mutation der Tyrosin-Kinase-Domäne oder (3) in der Fähigkeit der Tumorzelle, weiter „downstream“ gelegene Effektorkinasen der Signaltransduktionskette unabhängig von der Inhibition der „upstream“ gelegenen Schlüsselmoleküle (wie z. B. EGFR) zu aktivieren (Al-Batran SE, Jäger E, 2007). Bei anderen Tumorentitäten hingegen konnte eine Korrelation zwischen Rezeptorexpression und Suszeptibilität gegenüber einer mAk-Therapie beobachtet werden. So wird die Gabe von Trastuzumab beim Mammakarzinom nur bei HER2/neu positivem Befund durchgeführt (Müller M *et al.*, 2010).

Larbouret *et al.* zeigten 2007 einen synergistischen Effekt in einer *in vivo* Studie eines EGFR-Antikörpers kombiniert mit einem HER2/neu-Antikörper. Nacktmäusen wurden Tumoren der Zelllinien MIA PaCa-2 und BxPC-3 injiziert. Die kombinierte Gabe der Antikörper erbrachte stärkere positive Effekte, als die vierfache Menge der Monotherapie eines Antikörpers (Larbouret C *et al.*, 2007). In weiterführenden Studien könnte somit der Effekt einer Kombinationstherapie von Panitumumab und Trastuzumab genauer betrachtet werden. In eigenen Untersuchungen, bei denen beide mAk kombiniert *in vitro* eingesetzt wurden, konnte dieser synergistische Effekt nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

5.2.3.2 Mutationsstatus der Zelllinien und Therapieansprechen

Dass eine Überexpression von EGFR mit einer Tumorprogression einhergeht, ist unstrittig (Weiner LM *et al.*, 2008). Durch die Bindung eines Liganden am extrazellulären Teil des EGFR bzw. Her2/neu kommt es zu einer Phosphorylierung der intrazellulär gelegenen Tyrosinkinaseuntereinheit. Diese Rezeptoraktivierung führt wiederum zu einer Aktivierung intrazellulärer Effektoren, wie das G-Protein KRAS, die Proteinkinase Raf und die Phosphoinositol-3-Kinase (PI-3-Kinase), die in intrazelluläre Signaltransduktionswege involviert sind. Trastuzumab und Panitumumab binden hochspezifisch an Her2/neu bzw. den EGFR und blockieren so die ligandenaktivierte Phosphorylierung der Rezeptoren. Theoretisch sollte es so zu einer Hemmung des Tumorzellwachstums durch den mAk kommen (Lièvre A *et al.*, 2006). Der Einfluss des mAk auf das Wachstumsverhalten der Tumorzellen abhängig vom KRAS Mutationsstatus wird in der Literatur unterschiedlich eingeschätzt. Die Häufigkeit der KRAS Mutationen liegen in Höhe von 75 - 90 % beim Adenokarzinom des Pankreas und bei 35 - 50 % beim kolorektalen Karzinom (Eijk R van *et al.*, 2010). Aber nur bei 60 - 70 %

der KRK Wildtypumoren zeigt sich eine anti-EGFR-Therapie erfolgreich (García-Sáenz JA *et al.*, 2009). Larbouret *et al.* fanden keine Korrelation zwischen Mutationsstatus und Effektivität der Therapie mit mAk. Bei Nacktmäusen, die mit humanen Pankreaskarzinomzellen (u.a. MIA PaCa-2 und BxPC-3) infiziert wurden, zeigte sich nach kombinierter Gabe von Cetuximab und Trastuzumab eine zeit- und dosisabhängige wachstumshemmende Wirkung auf die Tumorzellen. Es bestand jedoch keine Korrelation zwischen dem Mutationsstatus und dem Therapieeffekt (Larbouret C *et al.*, 2010). Tiemann *et al.* untersuchten die Wirkung von Panitumumab auf Tumorzellen mit und ohne *KRAS* Mutation. Sie registrierten eine konzentrationsabhängige Wachstumsinhibition bei Zellen mit *KRAS* Mutation, die beim Wildtyp nicht zu verzeichnen war (Tiemann N *et al.*, 2011). Im Gegensatz dazu stehen die Untersuchungen von Lièvre *et al.* an KRK Zellen. Sie beobachteten bei allen Cetuximab-responsiven Patienten einen *KRAS* Wildtyp und sahen somit einen signifikanten Zusammenhang zwischen nicht mutiertem *KRAS* Mutationsstatus und Therapieerfolg (Lièvre A *et al.*, 2006). Die Zulassung des EGFR-mAk Panitumumab wurde an das Fehlen einer *KRAS* Mutation gebunden (Al-Batran SE, Jäger E, 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl Tumorzellen mit einem *KRAS* Wildtyp (BxPc-3, HROC18, HROC60), als auch Zellen, die eine *KRAS* Mutation tragen (MIA PaCa-2, T3M4, HCT116, vergl. Tab. 3), untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass auch die Zellen mit mutiertem *KRAS* Status auf die Therapie mit Trastuzumab und Panitumumab mit einem verminderten Wachstum reagieren. In der Klinik erhalten zur Zeit jedoch ausschließlich Patienten mit wildtypischem *KRAS* Zugang zu dieser zielgerichteten Therapie.

Es gibt *KRAS* Mutationen, vor allem in Codon 12 und 13, die die Wirksamkeit von Panitumumab nicht beeinflussen. Diese machen etwa 1 % der Mutationen aus und sind somit sicher keine adäquate Erklärung für die Responsibilität der mAk-Therapie mutierter Zellen (Bardelli A, Siena S, 2010).

Erklärungsversuche für das Nichtansprechen des Wildtyps auf anti-EGFR-mAk sind vielfältig. Wachstum und Proliferation der Zellen werden unter Umständen durch andere Signalwege und Rezeptoren stimuliert. Auch kann der Phosphorylierungsgrad der EGF-Rezeptoren eine Rolle spielen oder die Dichte der Rezeptoren auf der Tumorzelloberfläche. Zu beachten wäre auch der Status des *KRAS* Effektors b-raf und alternative intrazelluläre Signalwege wie PIK3CA/PTEN/AKT und JAK/STAT (García-Sáenz JA *et al.*, 2009). Eine weitere mögliche Ursache kann die zu gering gewählte Konzentration der verwendeten Antikörper sein. Xu *et al.* haben verschiedene Gallengangskarzinomzelllinien mit dem EGFR mAk Cetuximab behandelt. Sie fanden nur bei einer der untersuchten Zelllinien (TFK-1,

KRAS Mutation negativ) apoptotische Effekte ab einer Konzentration von 1 mg/ml Cetuximab (Xu L *et al.*, 2010). Dies liegt jedoch deutlich über der derzeit zugelassenen therapeutischen Konzentration von 0,01 mg/ml, weshalb die Ergebnisse kritisch zu beurteilen sind.

Tab. 3: Mutationsprofil der untersuchten Zelllinien

Zelllinie	<i>KRAS</i> Mutationsstatus	weitere mutierte Gene
MIA PaCa-2	mut	<i>CDKN2A</i> , <i>TP53</i>
BxPC-3	wt	<i>TP53</i> , <i>DPC4</i>
T3M4	mut	<i>TP53</i>
HROC18	wt	<i>APC</i>
HROC60	wt	<i>APC</i>
HCT116	mut	-

mut mutiert
wt Wildtyp

5.2.4 Bakterielle Monotherapie mit avitalen Streptokokken

Der Mechanismus der bakteriellen Infektion durch Streptokokken ist gut verstanden. Dringen *S. pyogenes* in humanes Gewebe ein, kommt es zunächst über bakterielle Rezeptoren wie das M-Protein oder die LTA zur Adhäsion und dann zur Invasion in die Zielzellen. Diese wird unter anderem über die Bindung des M-Proteins an Laminin und Integrin der Zielzelloberfläche gefördert. Gleichzeitig besitzen die Bakterien verschiedene extrazelluläre Toxine (Streptokinase, Streptolysin O und S und die erythrogenen Toxine A, B und C), welche direkt zytolytisch wirken. Durch die Infektion mit *S. pyogenes* wird die Freisetzung verschiedener Zytokine (IL-1, IL-6, TNF- α , INF- γ) getriggert, die vor allem phagozytierende neutrophile Granulozyten ins Gewebe locken (Courtney HS *et al.*, 2002). Streptokokken verfügen somit über eine Vielzahl von Virulenzfaktoren, mit deren Hilfe sie unterschiedliche Infektionskrankheiten verursachen. Dazu gehören unter anderem die Streptokokkenpharyngitis, Scharlach und Infektionen der Haut (Erysipel, Phlegmone, Impetigo contagiosa) (Hof H, Dörries R, 2005b). Diese zytotoxischen Reaktionen, zu denen zum Beispiel die Caspaseaktivierung mit darauffolgender Apoptose gehört, werden durch vitale *S. pyogenes* hervorgerufen (Klenk M *et al.*, 2007). Dass aber auch avitale *S. pyogenes* und Lysate von *S. pyogenes* eine zytotoxische Wirkung gegenüber Tumorzellen aufweisen, wurde in der Literatur mehrfach beschrieben (Hoption Cann SA *et al.*, 2003; Koido S *et al.*, 2007; Linnebacher M *et al.*, 2008). Ausgehend von diesen Untersuchungen stellte sich die

Frage, inwiefern auch HDI und EI Streptokokken zytotoxische Effekte gegenüber humanen Tumorzellen vermitteln. Es wurde festgestellt, dass nach beiden Inaktivierungsvarianten die Bakterien eine Schädigung der Zielzellen vermitteln können. In ersten Voruntersuchungen, bei denen die Invasivität der Bakterien gegenüber den Tumorzellen analysiert wurde, zeigte sich, dass bei beiden Inaktivierungsverfahren intrazelluläre Bakterien in den Tumorzellen detektiert werden konnten. Die HDI Streptokokken invadierten die Tumorzellen früher. Nach 24 h war das Invasionsniveau beider Inaktivierungsmethoden vergleichbar. Eine Ausnahme bildeten die KRK-Linien HROC18 und HROC60. Hier wurden deutlich weniger invasive Bakterien zu allen Zeitpunkten detektiert. Grund dafür kann eine geringer ausgeprägte Rezeptordichte auf der Tumorzelloberfläche sein, über die die Bakterien adhären und internalisiert werden. In nachfolgenden Untersuchungen, bei denen das Ausmaß der durch *S. pyogenes* induzierten Zellschädigung quantifiziert wurde, zeigte sich, dass die Bakterien nicht nur mit unterschiedlicher Affinität an die Tumorzellen binden, sondern zusätzlich Differenzen in der Effizienz der Zellschädigung bestehen. Hierbei wurden die Parameter metabolische Aktivität und Vitalität analysiert. Die zytotoxische Wirkung konnte – zumindest teilweise – auf die Invasion der Bakterien in die Tumorzellen zurückgeführt werden, denn die direkte Lyse von Tumorzellen durch SLS und SLO wurde in der Literatur mehrfach beschrieben (Fuller JD *et al.*, 2002; Yang WS *et al.*, 2006). Weitere Virulenzfaktoren, wie z.B. LTA und die Hyaluronsäurekapsel, deren zytolytisches Potenzial u.a. gegenüber Epithelzellen bekannt ist, scheinen ebenfalls an der Zellschädigung beteiligt zu sein (Leon O, Panos C, 1990).

Die Analysen in dieser Arbeit zeigten, dass EI Bakterien stärkere antitumorale Effekte vermitteln als HDI Streptokokken. Gründe für eine effizientere Therapie durch Ethanolinaktivierung könnten darin liegen, dass Virulenzfaktoren, die die zytotoxische Wirkung avitaler Streptokokken vermitteln, druckempfindlich sind und somit pathogenitätsrelevante Moleküle inaktiviert wurden. In der Folge weisen die Bakterien eine verminderte antitumorale Aktivität auf. Elektronenmikroskopisch wurde kein morphologischer Unterschied zwischen ethanol- und druckinaktivierten Bakterien gefunden (siehe Abb. 3; Kapitel Einleitung). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Demaskierung relevanter mikrobieller Strukturen durch die Behandlung mit Ethanol. So ist ebenfalls denkbar, dass die Behandlung mit Ethanol Proteine an der Zelloberfläche stabilisiert, welche dann gegenüber Tumorzellen schädigende Effekte vermitteln.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse bei bakterieller Monotherapie lassen keinen Schluss auf Apoptose als Zelltod zu, denn der Nachweis eines Anstiegs des SubG1-Peaks war bei allen untersuchten Zelllinien negativ. In einer vorhergehenden

Untersuchung der Arbeitsgruppe wurde der nekrotische Zelltod für KRK-Linien nachgewiesen, die zuvor mit ethanolinaktivierten *S. dysgalacticae* *ssup. equisimilis* behandelt wurden (Göttmann N, 2010, unveröffentlichte Daten). Weiterhin konnte in der Arbeitsgruppe beim Einfluss vitaler *S. pyogenes* auf humane KRK-Linien ein direkter Zusammenhang zwischen bakterieller Zytotoxizität und dem SubG1-Peak nachgewiesen werden (Pollak B, 2009, unveröffentlichte Daten). Somit ist davon auszugehen, dass die Inaktivierung der Bakterien durch Ethanol und Druck die zellschädigenden Wirkungen nicht beeinflusst, die proapoptotischen Effekte hingegen nur von lebenden Bakterien vermittelt werden.

Interessante Beobachtungen ergaben sich hinsichtlich der Verteilung der Tumorzellen im Zellzyklus. Zellen, die einmal das Signal zur Zellteilung erhalten haben, treten in die aktive Phase des Zellzyklus über. Zunächst befindet sich die Zelle in der G1-Phase. Hier bereitet sie sich auf die Verdopplung der DNA vor. Am Ende der G1-Phase durchläuft die Zelle einen Restriktionspunkt. Ist dieser überwunden, folgt der Übertritt in die S-Phase, in der die DNA Replikation stattfindet. Während der darauf folgenden G2-Phase bereitet sich die Zelle auf die Teilung vor. Weiterhin wird die replizierte DNA mittels Reparaturenzymen überprüft. In der nun folgenden M-Phase findet die eigentliche Teilung durch Mitose statt (Mullapudi B *et al.*, 2010a). Die Zelllinien T3M4 und HCT116 zeigten hier die deutlichsten Veränderungen im Zellzyklus. Tumorzellen, die mit *S. pyogenes* therapiert wurden, befanden sich, im Gegensatz zu unbehandelten Kontrollzellen, nach 72 Stunden in der G0/G1 und hauptsächlich in der S Phase. Dahingegen konnten nahezu keine Zellen in der G2 Phase (insbesondere bei der Zelllinie T3M4) detektiert werden. Dies lässt darauf schließen, dass durch *S. pyogenes* der Zellzyklus kurz vor der Teilung gestoppt wird. Diese Befunde untermauern somit die Beobachtungen zur Vitalität und metabolischen Aktivität, welche nach Behandlung zelllinienspezifisch deutlich reduziert war. Sie zeigen auch, dass die durch Bakterien vermittelten Effekte zwar das Wachstum prinzipiell beeinflussen, jedoch im Hinblick auf Apoptoseinduktion nur einen marginalen Einfluss haben. Folglich wurde keine Apoptose in den Zielzellen nachgewiesen. Die direkte Wirkung der Bakterien kann somit Nekrose induzierend, aber auch zytostatisch sein.

Tumorzellen, die mit einem Zellzyklus alterierendem Agens behandelt werden, reagieren oftmals nicht primär mit einem Stopp und einer Reparatur des Zellzyklus. In solchen Fällen sind die Gene in den Tumorzellen mutiert, die für Zellzykluscheckpointproteine kodieren. Erst nach weiteren Teilungen und Verbreitung ihrer geschädigten DNA tritt der Zelltod ein. Dabei kommt es bei der Potenz des Agens, den Zellzyklus zu verändern nicht nur auf die Art der Tumorzellen und die Art des Therapeutikums an, sondern auch auf die applizierte Menge

und die Phase des Zellzyklus der Tumorzelle, in der sie sich zum Applikationszeitpunkt befindet (Sakaue-Sawano A *et al.*, 2011). Eine Synchronisation des Zellzyklus der zu behandelnden Zellen sollte demnach in weiterführenden Untersuchungen berücksichtigt werden. Eine Apoptose muss jedoch trotz fehlendem Nachweis nicht ausgeschlossen werden. Beispielsweise können Veränderungen in der Konzentration der applizierten Menge an *S. pyogenes* oder auch in der Untersuchungs- und Inkubationsdauer möglicherweise auch in einem messbaren Anteil apoptotische Reaktionen auslösen.

Die Differenzierung zwischen apoptotischer, nekrotischer oder zytostatischer Wirkung von *S. pyogenes* auf Tumorzellen sollte Gegenstand zukünftiger Studien sein, um die antitumorale Wirkung besser verstehen und therapeutisch nutzen zu können.

5.2.5 Kokulturuntersuchungen in Anwesenheit von Immunzellen

5.2.5.1 mAk-Monotherapie

In der Literatur ist die ADCC vielfach beschrieben (Greenberg AH *et al.*, 1973; Burmester GR, Pezuzutto A, 1998b; Kimura K *et al.*, 2006). Hierbei handelt es sich um eine NK-Zell-Reaktion, bei der die Fc-Rezeptor tragenden NK-Zellen den Fc-Teil eines tumorzellgebundenen Antikörpers binden. Nach Erkennung setzen die NK-Zellen zytoplasmatische Granula mit zytotoxischen Perforinen und Granzymen frei und die Tumorzelle wird zerstört (Burmester GR, Pezuzutto A, 1998b). Ein bekanntes *in vitro* Modell, um die ADCC nachzuweisen, ist die gemischte Lymphozytenkultur (*mixed lymphocyte culture*, MLC). Hierbei werden die Tumorzellen mit humanen peripheren mononukleären Blutzellen (*periphere blood mononuclear cells*, PBMC) kokultiviert und zusätzlich mit dem entsprechenden Therapieschema behandelt.

In dieser Arbeit wurden MLC mit den Pankreaskarzinom- und KRK-Zellen durchgeführt. Sowohl Trastuzumab als auch Panitumumab sind laut Literaturangaben in der Lage eine ADCC zu induzieren (Lee SC *et al.*, 2011; López-Albaitero A, Ferris RL, 2007). Dabei ist die Stärke der ADCC jedoch abhängig von der Art des mAk. IgG1-Moleküle, zu denen Trastuzumab gehört, lösen in der Regel deutlich stärkere ADCC-Reaktionen aus (Mellor JD *et al.*, 2013).

Der durchschnittliche Therapieerfolg lag bei 10 – 15 % Reduktion vitaler Tumorzellen nach 72 h Inkubationszeit. In einigen Fällen wurde nach transienter Reduktion eine nachfolgende Wachstumsstimulation beobachtet. Dies konnte unter anderem für die Zelllinien HROC18, sowohl nach Behandlung mit Panitumumab, als auch Trastuzumab, sowie bei HROC60 nach Therapie mit Panitumumab nachgewiesen werden. Entsprechendes gilt auch für die Zelllinie

MIA PaCa-2, wohingegen bei der Zelllinie T3M4 nach primärer Wachstumsstimulation, eine deutliche Hemmung nach 72 h zu verzeichnen war. Eine Erklärung für eine fehlende antitumorale Wirkung kann ein Polymorphismus der Fc γ -Rezeptoren, der von den NK-Zellen exprimiert wird, liefern (Lee SC *et al.*, 2011). Dabei kann es abhängig vom jeweiligen Polymorphismus der einzelnen Fc γ -Rezeptoren zu unterschiedlich starken Reaktionen auf die Behandlung mit einem mAk kommen. In den meisten von Mellor und Kollegen analysierten Studien zeigte sich ein gutes Therapieansprechen auf Trastuzumab beim homozygoten Fc γ 2A-Rezeptor (FCGR2A₁₃₁H/H) (Mellor JD *et al.*, 2013). Eine Mutation in diesem Bereich kann also ein schlechteres Ansprechen auf Trastuzumab begründen. Ein weiterer Grund für eine fehlende antitumorale Wirksamkeit kann die zu gering gewählte Antikörperkonzentration sein. López-Albaitero und Ferris detektierten eine ADCC durch Panitumumab erst bei einer Konzentration von 1-10 μ g/ml, wobei in dieser Arbeit die mAK-Konzentration bei 4 ng/ml lag (López-Albaitero A, Ferris RL, 2007).

Ein rezeptorexpressionsabhängiger Therapieerfolg, wie er für Her2/neu in der Literatur beschrieben wird (Kimura K *et al.*, 2006), war nicht zu detektieren.

5.2.5.2 Bakterielle Monotherapie

Wie bereits beschrieben, vermittelten avitale Streptokokken antitumorale Effekte. Ausgehend von diesen Befunden wurde in nachfolgenden Experimenten untersucht, ob diese Wirkung durch die Anwesenheit immunkompetenter Zellen verstärkt werden kann. Dies wurde unter Einsatz eines *in vitro* Kokultursystems realisiert, um den *in vivo* Bedingungen möglichst nahe zu kommen.

Es zeigte sich, dass die Zugabe immunkompetenter Zellen deutliche, synergistische Wirkungen erzielte. Nach 72 h der Behandlung mit *S. pyogenes* wurden bei der Zelllinie HCT116 die effektivsten Therapieerfolge beobachtet. Hier fand sich eine Reduktion der Tumorzellzahl um über 88 %. Aber auch alle anderen Zelllinien zeigten starke Zellzahlreduktionen von mindestens 63 %. Erklären können diese Beobachtungen die Effekte der aktiven unspezifischen Immunstimulation. Bakterielle Produkte, hier die inaktivierten *S. pyogenes*, aktivieren Makrophagen und NK-Zellen. Die aktivierten Makrophagen produzieren daraufhin Zytokine, wie TNF- α , Interferon- γ und Stickstoffmonoxid. Über diese Mediatoren kann in Tumorzellen Apoptose und Nekrose induziert werden. Erfolgreiche Anwendungen dieser Art wurden durch die intraläsionale Injektion von BCG beim Malignen Melanom und der lokalen Immunisierung mit BCG bei Blasentumoren durchgeführt (Roitt IM *et al.*, 1995). BCG stimuliert neben Makrophagen und NK-Zellen auch CD8⁺ T-Zellen, CD4⁺ T-Zellen, Lymphokin aktivierte NK-Zellen und neutrophile Granulozyten (Luo Y, Knudson MJ, 2010).

5.2.6 Kombinationstherapie

In parallelen Versuchsansätzen erfolgte die Kombinationstherapie. Hierbei wurden Bakterien mit therapeutischen mAk gekoppelt. Damit macht man sich die Eigenschaft der Gruppe A Streptokokken zunutze, den Fc-Teil von IgG zu binden (Nobbs AH *et al.*, 2009; Klier U *et al.*, 2012). Therapiestrategien, welche auf dem Einsatz von Bakterien *in vivo* basieren, konzentrieren sich bislang fast ausschließlich auf die lokale Applikation. Dies ist vor allem dadurch begründet, dass Bakterien nach systemischer Injektion nicht zielgerichtet den Tumor invadieren. Durch die Idee, Bakterien spezifisch an therapeutische mAk zu koppeln, könnte dieses Problem umgangen werden. So ist bekannt, dass mAk nach intravenöser Applikation ebenfalls zielgerichtet den Tumor infiltrieren. Demzufolge sollte die Konjugation an die mAk Bakterien ebenfalls gezielt zu dem Tumor rekrutieren. Erste Voruntersuchungen hierzu erfolgten in der vorliegenden Arbeit zunächst im *in vitro* System. Primäres Ziel hierbei war es, zu untersuchen, ob die Wirksamkeit der einzelnen Komponenten verstärkt oder – im negativen Fall – eventuell auch neutralisiert wird. Der Hypothese folgend führt die Bindung von mAk-Bakterienkonjugaten an die Rezeptoren der Tumorzelle, neben der Blockierung spezifischer intrazellulärer Signalwege, Bakterien gezielt an die Tumorzellen. Diese vermitteln eine direkte Toxizität, die zu Tumorzellschädigung führt. Bei Anwesenheit immunkompetenter Zellen werden die nun entstandenen Tumorzellfragmente von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) aufgenommen und anschließend auf der Zelloberfläche präsentiert. Dadurch kann eine tumorspezifische Immunantwort induziert werden, die zum Rückgang des Tumors und zu einem immunologischen Gedächtnis führt.

Insgesamt belegen die hier durchgeführten Analysen, dass die Konjugation von Bakterien an den Fc-Teil der mAk zu keiner gegenseitigen Inhibition der Wirkung führt. Es konnte in der Regel ein additiver Therapieeffekt beobachtet werden.

Attenuierte *S. typhimurium*, die Vektoren für VEGFR-2 darstellen und somit eine Kombination der aktiven Immuntherapie und der antiangiogenetischer Therapie sind, wurden von Niethammer und Kollegen zunächst im Tierversuch getestet. Das Ziel des Therapieansatzes ist, den VEGFR-2 so zu verändern, dass in Neovaskularisationen von Tumoren keine funktionsfähigen VEGFR-2 exprimiert werden und es so zum Kollaps der Gefäße kommt. Es fand sich eine signifikante Reduktion von Malignen Melanomen, Lungenkarzinomen und KRK bzw. ihren Metastasen, die vor allem auf die Zerstörung bestehender Tumorendothelzellen und die Generierung eines Immungedächtnisses gegen Endothelzellen, die eine Tumorversorgung aufbauen, zurückgeführt wird (Niethammer AG *et al.*, 2002). Eine klinische Phase-I-Studie läuft bereits mit Pankreaskarzinompatienten, die eine

Schluckimpfung mit *S. typhi* erhalten und somit ein weiteres Beispiel für eine systemische Applikation eines immuntherapeutischen Ansatzes darstellen (Niethammer AG *et al.*, 2012).

5.3 Zusammenfassender Vergleich der Therapieschemata

Pankreas- und KRK-Linien wurden mit *S. pyogenes*, mAk und der Kombination aus beidem therapiert. Die einzelnen Therapieoptionen stellen Varianten der aktiv-unspezifischen (*S. pyogenes*) und der passiv-spezifischen (mAk) Immuntherapie dar. Der Mechanismus des aktiv-unspezifischen Therapieansatzes ist die Nachahmung einer mikrobiellen Infektion, die das Immunsystem so stimulieren soll, dass eine geeignete gegen den Tumor gerichtete Immunantwort initiiert wird. Der passiv-spezifische Therapieansatz, der mit der Gabe von mAk realisiert wird, setzt das Vorhandensein von Antigenen, die nur von Tumorzellen exprimiert werden (z. B. CD20 beim niedrig malignen Non-Hodgkin-Lymphom) oder zumindest von Tumorzellen überexprimiert (z. B. Her2/neu beim Mammakarzinom) voraus. MAk sollen diese Antigene binden und dann von Fc-Rezeptor-tragenden NK-Zellen erkannt werden. Diese Zellen setzen daraufhin zytoplasmatische Granula mit zytotoxischen Perforinen und Granzymen frei, die die Tumorzelle angreifen. Weiterhin trägt aber auch der direkte Einfluss der mAk, wie z. B. die Blockade eines proliferativ wirksamen Signalwegs, zur Tumorregression bei. Kombiniert man diese beiden immuntherapeutischen Ansätze miteinander, spricht man gleichzeitig verschiedene Komponenten des Immunsystems an. So soll eine gegenüber der Monotherapie gesteigerte antitumorale Immunantwort ausgelöst werden. Des Weiteren kann durch die mAk gewährleistet werden, dass die Bakterien direkt an den Zielort – den Tumor – gelangen.

In dieser Arbeit erbrachte die mAk Monotherapie zumeist eine Reduktion der metabolischen Aktivität und Vitalität der Tumorzellen. Allerdings waren diese Effekte deutlich geringer, sowohl mit, als auch ohne Kokultivierung mit PBMC, im Vergleich zur *S. pyogenes* Monotherapie. Die Verteilung der Tumorzellen im Zellzyklus wurde nahezu nicht beeinflusst. Die *S. pyogenes* Monotherapie zeigte im Allgemeinen deutliche antitumorale Effekte. Sowohl die metabolische Aktivität, als auch die Vitalität aller Zelllinien konnte in unterschiedlichem Maße durch die Bakterien gemindert werden. Auch die Zellzyklusverteilung änderte sich unter dem Einfluss der Streptokokken. Bei der Kokultivierung mit PBMC waren die antitumoralen Effekte am deutlichsten, sodass *in vivo* Untersuchungen folgen sollten. Die Kombination beider immuntherapeutischer Ansätze führte zu einer gesteigerten antitumoralen Antwort. Auch die Veränderungen der Zellzyklusverteilungen traten bei der Kombinationsbehandlung erneut auf. Die prägnanten Effekte, die in der MLC mittels *S.*

pyogenes erzielt wurden, zeigten sich noch deutlicher bei Kombination von Streptokokken und mAk.

6 Zusammenfassung

Maligne Tumoren des Pankreas und des Kolons sind Erkrankungen mit oftmals ungünstiger Prognose. Ihre Pathogenese ist noch nicht vollständig aufgeklärt, vermutlich entstehen sie auf dem Boden dysplastischer Vorläuferläsionen. Die Progression der Erkrankungen wird von einer Akkumulation somatischer Mutationen begleitet, insbesondere beim kolorektalen Karzinom (KRK) auch von epigenetischen Faktoren. Einen wichtigen Risikofaktor für das Pankreaskarzinom stellt das Rauchen dar, auch eine chronische Pankreatitis erhöht die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der Tumorerkrankung. Beim KRK sind neben dem Rauchen auch eine ballaststoffarme Ernährung und Bewegungsmangel ätiologisch wichtige Faktoren. Beide Erkrankungen zeichnen sich durch eine anfangs unspezifische Symptomatik aus, sodass insbesondere das Pankreaskarzinom oft erst in einem späten Stadium erkannt wird. Beim KRK wird die Früherkennung durch koloskopische Untersuchungen gefördert.

Eine chirurgische Therapieoption als einzig kurativer Ansatz besteht insbesondere beim Pankreaskarzinom nur bei wenigen Patienten. Die Wirksamkeit von Radio- und Chemotherapie ist ebenfalls begrenzt. Neue Therapieansätze zur Behandlung des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms und des KRK sind dringend erforderlich.

Vor mehr als 120 Jahren hat der New Yorker Chirurg und Onkologe William Coley erkannt, dass starke bakterielle Infektionen antitumoral wirken. Daraus wurde das Konzept der bakteriellen Tumorimmuntherapie entwickelt, das die Induktion einer tumorspezifischen Immunantwort und Vermittlung einer protektiven Immunität gegenüber den Tumorzellen des Primärtumors und seiner Metastasen zum Ziel hat. Allerdings verfügen viele Tumoren über ausgeprägte Schutzmechanismen, um dem Immunsystem zu entkommen. Dazu gehören zum Beispiel die Herunterregulation von MHC-I-Molekülen auf der Tumorzelloberfläche oder die Sekretion immunsuppressiver Substanzen (z. B. IL-10, TGF- β). Somit entsteht eine Toleranz gegenüber Tumorzellen, die mittels multimodaler Ansätze der Immuntherapie aufgehoben werden soll. Durch eine Konjugation von Bakterien an die monoklonalen Antikörper (mAk) Trastuzumab, der an den Her2/neu und Panitumumab, der an den EGFR bindet, soll ein zielgerichteter Transport der Bakterien zu den Tumorzellen realisiert werden. Die Überexpression von EGFR und Her2/neu auf der Zelloberfläche ermöglicht eine besonders hohe Konzentration der mAk und somit auch der Streptokokken in Tumornähe.

Ziel dieser Arbeit war eine Charakterisierung der biologischen Wirkungen von *S. pyogenes*, Trastuzumab und Panitumumab und deren Kombinationen. Die Streptokokken wurden vor ihrer therapeutischen Verwendung mit Hochdruck (400 MPa, 30 min, 20 °C) oder Ethanol (40 %, 30 min, 20 °C) inaktiviert. Zunächst wurde sowohl die Wirkung der Bakterien, als auch

der mAk einzeln analysiert und danach mit den Ergebnissen der Kombinationstherapien verglichen.

Die Ergebnisse basieren auf Experimenten an humanen Zellkulturen. Untersuchungsgegenstand waren die pankreatischen Tumorzelllinien BxPC-3, MIA PaCa-2 und T3M4 und die KRK-Linien HCT116, HROC18 und HROC60. Es wurden die EGFR- und Her2/neu-Expressionsprofile charakterisiert. Die Internalisierung der Bakterien in die Tumorzellen wurde mit Hilfe der Fluoreszenzdurchflusszytometrie analysiert. Die metabolische Aktivität nach therapeutischer Behandlung wurde mit Hilfe des WST-1 Assays gemessen. Der Anteil vitaler Zellen ließ sich mittels Calcein-AM Färbung ermitteln. Neben einer Zellzyklusanalyse stellte sich auch die Frage nach der Art des Zelluntergangs, sodass mittels SubG1-Peak Analyse eventuell vorhandene apoptotische Zellen detektiert werden konnten. Um den immunologischen Gegebenheiten *in vivo* möglichst nahe zu kommen, wurden immunkompetente Zellen (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*, periphere mononukleäre Blutzellen) mit den Tumorzellen in einer direkten Kokultur inkubiert. Eine Beeinflussung der Tumorzellen auf molekularer Ebene wurde mit der quantitativen RNA-Analyse von Toll-like-Rezeptoren 3, 5, 6 und 9, das Apoptoseinduktionsgen *BAX* und die Zellzyklusregulatorgene *CDKN1A* und *CDKN2A* untersucht.

Eine antitumorale Wirksamkeit der Streptokokken war sowohl in der Senkung der metabolischen Aktivität, als auch in der Senkung des Anteils vitaler Zellen nachweisbar. Die mAk-Monotherapie erbrachte heterogene Ergebnisse. Teilweise war hier eine Wachstumsstimulation zu beobachten. Eine Kombination der beiden immuntherapeutischen Ansätze erwies sich als vielversprechend und zeigte additive Effekte im Vergleich zur *S. pyogenes*-Monotherapie. Eine Verstärkung der antitumoralen Wirkung war insbesondere bei der Kokultivierung mit PBMC zu verzeichnen. Der Zellzyklus wurde dahingehend beeinflusst, dass sich der Anteil von Zellen, die mit *S. pyogenes* behandelt wurden, in der G0/G1- und in der G2/M-Phase reduzierte. Dafür zeigte sich ein erhöhter Anteil von Zellen in der S-Phase. Apoptose konnte als Mechanismus für den Tumorzellrückgang nach therapeutischer Behandlung durch die SubG1-Peak Analyse und die Analyse der Apoptosegene nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sich durch avitale *S. pyogenes* antitumorale Effekte gegenüber Pankreas- und KRK-Zellen *in vitro* induzieren lassen. Eine Kombination mit Trastuzumab bzw. Panitumumab erbringt eine weitere Steigerung der antitumoralen Wirksamkeit. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse können als

Ausgangspunkt weiterer Studien zur immunologischen Tumorthherapie dienen und die Basis für weitere präklinische und klinische Studien bilden.

7 Literaturverzeichnis

1. **Agrawal N**, Bettegowda C, Cheong I: Bacteriolytic therapy can generate a potent immune response against experimental tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 15172-15177
2. **Al-Batran SE**, Jäger E (2007): Ausblick: neue Substanzen, neue Therapiestrategien. In: Bokemeyer C (Hrsg.): Das kolorektale Karzinom – Grundlagen, Prävention und moderne Therapiekonzepte. Socio-medico Verlag, Wessobrunn, 295-320
3. **Almoguerra C**, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M: Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 1988; 53: 549-554
4. **Andrén-Sandberg Å**, Bäckman PL (2000): Demography and Epidemiology of Pancreatic Cancer. In Dervenis CG, Bassi C (Hrsg.): Pancreatic Tumors. Achievements and Prospective. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 16-22
5. **Ashbaugh C**, Moser T, Shearer M, White G, Kennedy R, Wessels M: Bacterial determinants of persistent throat colonization and the associated immune response in a primate model of human group A streptococcal pharyngeal infection. *Cell Microbiol* 2000; 2: 283-292
6. **Aspinall-O'Dea M**, Neoptolemos J, Costello E (2010): Proteomic analysis of blood and pancreatic juice. In: Han H, Grippo P (Hrsg.): Drug discovery in pancreatic cancer. Models and techniques. Springer, New York Dordrecht Heidelberg, 223-241
7. **Bardelli A**, Siena S: Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28(7): 1254-1261
8. **Bareschino MA**, Schettino C, Rossi A, Maione P, Sacco PC, Zeppa R, Gridelli C: Treatment of advanced non small cell lung cancer. *J Thorac Dis* 2011; 3(2): 122-133
9. **Barnes JP**: Physiologic Resection of the Right Colon. *Surg Gynec Obstet* 1952; 94: 723

10. **Bartlett** DH: Pressure effects on in vivo microbial processes. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1595(1-2): 367-381
11. **Bjerkvig** R, Tysnes BB, Aboody KS, Najbauer J, Terzis AJ: The origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nat Rev Cancer* 2005, 5(11): 899-904
12. **Böcker** W, Höfler HK, Lax S, Poremba C, Moll R, Tannapfel A, Probst-Hensch N (2008): Kapitel 6. Tumorerkrankungen. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H (Hrsg): Pathologie 4., vollständig überarbeitete Auflage, Urban und Fischer, München Jena, 188
13. **Boyer** CM, Pusztai L, Wiener JR, Xu FJ, Dean GS, Bast BS, O'Briant KC, Greenwald M, DeSombre KA, Bast RC Jr: Relative cytotoxic activity of immunotoxins reactive with different epitopes on the extracellular domain of the c-erbB-2 (HER-2/neu) gene product p185. *Int J Cancer* 1999; 82(4): 525-531
14. **Bramhall** SR, Rosemurgy A, Brown PD, Bowry C, Buckels JAC: Marimastat as first-line therapy for patients with unresectable pancreatic cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3447-3455
15. **Brunner** TB, Cengel KA, Hahn SM, Wu J, Fraker DL, McKenna WG, Bernhard EJ: Pancreatic cancer cell radiation survival and prenyltransferase inhibition: the role of K-Ras. *Cancer Res* 2005; 65(18): 8433-8441
16. **Bühling** KJ, Lepenies J, Witt K (2008): Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie. 4. Auflage, Urban und Fischer, München, Jena, 287
17. **Bühling** KJ, Lepenies J, Witt K (2004): Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie. 3. Auflage, Urban und Fischer, München, Jena, 230
18. **Burden** RE, Gormley JA, Jaquin TJ, Small DM, Quinn DJ, Hegarty SM, Ward C, Walker B, Johnston JA, Olwill SA, Scott CJ: Antibody-mediated inhibition of cathepsin S blocks colorectal tumor invasion and angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2009; 15(19): 6042-6051

19. **Burmester** GR, Pezuzutto A (1998): Tumorimmunologie. In: Burmester GR, Pezuzutto A et al. (Hrsg.): Taschenatlas der Immunologie. Grundlagen, Labor, Klinik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 140, a
20. **Burmester** GR, Pezuzutto A (1998): Tumorimmunologie. In: Burmester GR, Pezuzutto A et al. (Hrsg.): Taschenatlas der Immunologie. Grundlagen, Labor, Klinik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 144, b
21. **Chames** P, Kerfelec B, Baty D: Therapeutic antibodies for the treatment of pancreatic cancer. *Scientific World Journal* 2010; 10: 1107-1120
22. **Cho** KR, Vogelstein B: Genetic Alterations in the Adenoma-Carcinoma-Sequence. *Cancer Supplement* 1992; 70(6): 1727-1729
23. **Courtney** HS, Hasty DL, Dale JB: Molecular mechanisms of adhesion, colonization, and invasion of group A streptococci. *Ann Med* 2002; 34: 77-87
24. **Coley** WB: The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus). *Proc R Soc Med* 1910; 3(Surg Sect): 1-48
25. **Cue** D, Dombek P, Lam H, Cleary P: *Streptococcus pyogenes* serotype M1 encodes multiple pathways for entry into human epithelial cells. *Infect Immun* 1998; 66: 4593-4601
26. **Culman** J (2010): Kapitel 20. Zystatika. In: Herdegen T (Hrsg.): Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2. Auflage, 315
27. **Cunningham** M: Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 470-511
28. **Cunningham** MP, Thomas H, Fan Z et al.: Responses of human colorectal tumor cells to treatment with the anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody ICR62 used alone and in combination with EGFR tyrosin kinase inhibitor gefitinib. *Cancer Res* 2006; 66: 7708-7715
29. **Cywes** C, Stamenkovic I, Wessels MR: CD44 as a receptor for colonization of the pharynx by group A streptococci. *J Clin Invest* 2000; 106: 995-1002

30. **Daniel P** (2008): Molekulare Grundlagen der Apoptose. In: Ganten D, Ruckpaul K (Hrsg.): Grundlagen der Molekularen Medizin. 3., überarbeitete und erweiterte Auflage; Springer Berlin Heidelberg, 159-203
31. **Dietel M**, Tannapfel A, Baretton G, Kreipe H, Kloor M, Gabbert H, Kirchner T: Molecular pathologic KRAS mutation analysis. A prerequisite of effective antibody treatment for metastasized colorectal cancer. *Chirurg* 2008; 79(6): 576-579
32. **Dombek P**, Cue D, Sedgewick J, Ruschkowski, Finlay B, Cleary P: High frequency intracellular invasion of epithelial cells by serotype M1 group A streptococci: M1 protein-mediated invasion and cytoskeletal rearrangements. *Mol Microbiol* 1999; 31: 859-870
33. **Eijk R van**, Puijenbroek M van, Chhatta AR, Gupta N, Vossen RH, Lips EH, Cleton-Jansen AM, Morreau H, Wezel T van: Sensitive and specific KRAS somatic mutation analysis on whole-genome amplified DNA from archival tissues. *J Mol Diagn* 2010; 12(1): 27-34
34. **Eikhoff A**, Riemann LF: Das Kolonkarzinom. Aktueller Stand von Früherkennung und endoskopischer Prävention. *Der Internist*, Springer-Verlag Berlin/Heidelberg 2000; 41: 860-867
35. **Fibbe C**, Rosien U, Zirngibl H, Layer P (2000): Kapitel 13.7. Solide Tumoren. In: Layer P, Rosien U (Hrsg.): Praktische Gastroenterologie. Urban & Fischer, München, 411-412
36. **Finkelstein SD**, Przygodzki R, Pricolo VE, Sayegh R, Bakker A, Swalsky PA, Keller G: K-ras-2 topographic genotyping of pancreatic adenocarcinoma. *Arch Surg* 1994; 129: 367-372
37. **Follonier S**, Panke S, Zinn M: Pressure to kill or pressure to boost: a review on the various effects and applications of hydrostatic pressure in bacterial biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012; 93(5): 1805-1815
38. **Folprecht G** (2007): Neoadjuvante Chemotherapie bei Patienten mit Lebermetastasen. In: Bokemeyer C (Hrsg.): Das kolorektale Karzinom – Grundlagen, Prävention und moderne Therapiekonzepte. Socio-medico Verlag, Wessobrunn, 179-180

-
39. **Freitas** D, Fernandes Gdos S, Hoff PM, Cunha JE: Medical management of pancreatic adenocarcinoma. *Pancreatology* 2009; 9(3): 223-32
 40. **Fuller** JD, Camus AC, Duncan CL, Nizet V, Bast DJ, Thune RL, Low DE, De Azavedo JC: Identification of a streptolysin S-associated gene cluster and its role in the pathogenesis of *Streptococcus iniae* disease. *Infect Immun* 2002; 70: 5730-5739
 41. **Gagos** S, Iliopoulos D, Tseleni-Balafouta S, Agapitos M, Antachopoulos C, Kostakis A, Karayannakos P, Skalkas G: Cell senescence and a mechanism of clonal evolution leading to continuous cell proliferation, loss of heterozygosity, and tumor heterogeneity: studies on two immortal colon cancer cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 1996; 90:157-165
 42. **García-Sáenz** JA, Sastre J, Díaz-Rubio García E: Biomarkers and anti-EGFR therapies for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Clin Transl Oncol* 2009; 11(11): 737-747
 43. **Giannopoulou** E, Antonacopoulou A, Floratou K, Papavassiliou AG, Kalofonos HP: Dual targeting of EGFR and HER-2 in colon cancer cell lines. *Cancer Chemoter Pharmacol* 2009; 63: 973-981
 44. **Gollwitzer** H, Mittelmeier W, Brendle M, Weber P, Miethke T, Hofmann GO, Gerdesmeyer L, Schauwecker J, Diehl P: High Hydrostatic Pressure for Disinfection of Bone Grafts and Biomaterials: An Experimental Study. *The Open Orthopaedics Journal* 2009; 3: 1-7
 45. **Göttmann** N: Wirkung der Kombination von therapeutischen Antikörpern und ethanolinaktivierten Bakterien auf humane Kolonkarzinomzellen. Diplomarbeit, 2010
 46. **Graeven** U, Dienes HP, Becker T, Schmiegel W (2000): Kapitel 64. Pankreastumoren: In: Adler G, Beglinger C, Manns MP, Müller-Lissner S, Schmiegel W (Hrsg.): Klinische Gastroenterologie und Stoffwechsel. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 738
 47. **Greenberg** AH, Shen L, Roitt IM: Characterization of the antibody-dependent cytotoxic cell. A non-phagocytic monocyte? *Clin exp Immunol* 1973; 15, 251-259

48. **Greten** TF, Kubicka S (2007): Das kolorektale Karzinom: molekulargenetische Grundlagen der Karzinogenese. In: Bokemeyer C (*Hrsg.*): Das kolorektale Karzinom – Grundlagen, Prävention und moderne Therapiekonzepte. Socio-medico Verlag, Wessobrunn, 11-14, a
49. **Greten** TF, Kubicka S (2007): Das kolorektale Karzinom: molekulargenetische Grundlagen der Karzinogenese. In: Bokemeyer C (*Hrsg.*): Das kolorektale Karzinom – Grundlagen, Prävention und moderne Therapiekonzepte. Socio-medico Verlag, Wessobrunn, 20-29, b
50. **Gross** M, Lehle K, Jaenicke R, Nierhaus KH: Pressure-induced dissociation of ribosomes and elongation cycle intermediates. *Eur J Biochem* 1993; 218(2): 463-468
51. **Hahn** SA, Hoque ATM, Moskaluk CA, Costa LT da, Schutte M, Rozenblum E, Seymour AB, Weinstein CL, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE: Homozygous deletion map at 18q21.1 in pancreatic cancer. *Cancer Res* 1996; 56: 490-494
52. **Hahn** SA, Schmiegel, WH: Recent discoveries in cancer genetics of exocrine pancreatic Neoplasia. *Digestion* 1998, 59: 493-501
53. **Hanahan** D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70
54. **Herold** G und Mitarbeiter (*Hrsg.*) (2009): Innere Medizin. Gerd Herold, Köln, 462-465, a
55. **Herold** G und Mitarbeiter (*Hrsg.*) (2009): Innere Medizin. Gerd Herold, Köln, 466, b
56. **Herold** G und Mitarbeiter (*Hrsg.*) (2009): Innere Medizin. Gerd Herold, Köln, 464, c
57. **Herold** G und Mitarbeiter (*Hrsg.*) (2009): Innere Medizin. Gerd Herold, Köln, 391, d
58. **Herold** G und Mitarbeiter (*Hrsg.*) (2009): Innere Medizin. Gerd Herold, Köln, 478-480, e
59. **Herold** G und Mitarbeiter (*Hrsg.*) (2012): Innere Medizin. Gerd Herold, Köln, 486

-
60. **Hof H, Dörries R** (2005): Medizinische Mikrobiologie. 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 307-308, a
 61. **Hof H, Dörries R** (2005): Medizinische Mikrobiologie. 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 309-311, b
 62. **Hof H, Dörries R** (2005): Medizinische Mikrobiologie. 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 313, c
 63. **Hoption Cann SA, Netten van JP, Netten van C**: Dr William Coley and tumor regression: a place in history or in the future. *Postgrad Med J* 2003; 79: 672-680
 64. **Jain RK, Forbes NS**: Can engineered bacteria help control cancer? *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(26): 14748-14750
 65. **Jean ME, Lowy AM, Chiao PJ, Evans DB** (2001): The Molecular Biology of Pancreatic Cancer. In: Evans DB, Pisters PWT, Abbruzzese JL (Hrsg.): Pancreatic Cancer. Springer, New York, 22-2
 66. **Jeong KE, Cairns JA**: Review of economic evidence in the prevention and early detection of colorectal cancer. *Health Econ Rev* 2013; 3(1): 20
 67. **Jochum W** (2008): Kapitel 31. Kolon, Rektum und Analkanal. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H (Hrsg): Pathologie 4., vollständig überarbeitete Auflage, Urban und Fischer, München Jena, 754, a
 68. **Jochum W** (2008): Kapitel 31. Kolon, Rektum und Analkanal. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H (Hrsg): Pathologie 4., vollständig überarbeitete Auflage, Urban und Fischer, München Jena, 767, b
 69. **Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, Vogelstein B**: Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* 1991; 252: 1708-171
 70. **Khare S, Verma M**: Epigenetics of colon cancer. *Methods Mol Biol.* 2012; 863: 177-185

-
71. **Kimble** RJ, Vaseva AV, Cox AD, Baerman KM, Calvo BF, Tepper JE, Shields JM, Carolyn I. Sartor CI: Radiosensitization of EGFR/HER2 positive pancreatic cancer is mediated by inhibition of Akt independent of Ras mutational status. *Clin Cancer Res* 2010; 16(3): 912-923
 72. **Kimura** K, Sawada T, Komatsu M, Inoue M, Muguruma K, Nishihara T, Yamashita Y, Yamada N, Ohira M, Hirakawa K: Antitumor effect of trastuzumab for pancreatic cancer with high HER-2 expression and enhancement of effect by combined therapy with gemcitabine. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(16): 4925-4932
 73. **Klein** WM, Hruban RH, Klein-Szanto AJP, Wilentz RE: Direct Correlation Between Proliferative Activity and Dysplasia in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN): Additional Evidence for a Recently Proposed Model of Progression. *Modern Pathology* 2002; 4: 441-447
 74. **Klenk** M, Nakata M, Podbielski A, Skupin B, Schroten H, Kreikemeyer B: Streptococcus pyogenes serotype-dependent and independent changes in infected HEp-2 epithelial cells. *ISME J* 2007; 1(8): 678-692
 75. **Klier** U, Maletzki C, Kreikemeyer B, Klar E, Linnebacher M: Combining bacterial-immunotherapy with therapeutic antibodies: A novel therapeutic concept. *Vaccine* 2012; 30(17): 2786-2794
 76. **Klöppel** G, Sipos B, Lüttges J (2008): Kapitel 34. Pankreas. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H (Hrsg): Pathologie 4., vollständig überarbeitete Auflage, Urban und Fischer, München Jena, 838, a
 77. **Klöppel** G, Sipos B, Lüttges J (2008): Kapitel 34. Pankreas. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H (Hrsg): Pathologie 4., vollständig überarbeitete Auflage, Urban und Fischer, München Jena, 839-840, b
 78. **Koido** S, Hara E, Homma S, Torii A, Mitsunaga M, Yanagisawa S, Toyama Y, Kawahara H, Watanabe M, Yoshida S, Kobayashi S, Yanaga K, Fujise K, Tajiri H: Streptococcal preparation OK-432 promotes fusion efficiency and enhances induction of antigen-specific CTL by fusions of dendritic cells and colorectal cancer cells. *J Immunol* 2007; 178(1): 613-622

-
79. **Komminoth** P, Perren A, Klöppel G (2008): Kapitel 17. Disseminierte neuroendokrines System. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H (*Hrsg*): Pathologie 4., vollständig überarbeitete Auflage, Urban und Fischer, München Jena, 437
 80. **Korc** M, Chandrasekar B, Yamanaka Y, Friess H, Buchler M, Berger HG: Overexpression of the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer is associated with concomitant increases in the levels of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *J Clin Invest* 1992; 90: 1352-1360
 81. **Kremer** B, Schmid A (2007): Pankreas. In: Siewert JR (*Hrsg.*): Basiswissen Chirurgie. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 315
 82. **Kreikemeyer** B, Klenk M, Podbielski A: The intracellular status of *Streptococcus pyogenes*: role of extracellular matrixbinding proteins and their regulation. *Int J Med Microbiol* 2004; 294: 177-188
 83. **Lamm** DL (2008): Bacillus Calmette-Guérin Immunotherapy of Genitourinary Cancer. In: Orentas RJ, Hodge JW, Johnson BD (*Hrsg.*): Cancer Vaccines and Tumor Immunity. Wiley – Interscience, A John Wiley & Sons, Inc., Publication, Hoboken, New Jersey, 30-31
 84. **Lantz** E, Cunningham I, Higa GM: Targeting HER2 in breast cancer: overview of long-term experience. *Int J Womens Health* 2010; 1: 155-171
 85. **LaPenta** D, Rubens C, Chi E, Cleary P. Group A streptococci efficiently invade human respiratory epithelial cells. *Proc natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12115-12119
 86. **Larbouret** C, Robert B, Navarro-Teulon I, Thèzenas S, Ladjemi MZ, Morisseau S, Campigna E, Bibeau F, Mach JP, Pèleguin A, Azria D: In vivo therapeutic synergism of anti-epidermal growth factor receptor and anti-HER2 monoclonal antibodies against pancreatic carcinomas. *Clinical Cancer Research* 2007; 13: 3356
 87. **Larbouret** C, Robert B, Bascoul-Mollevis C, Penault-Llorca F, Ho-Pun-Cheung A, Morisseau S, Navarro-Teulon I, Mach JP, Pèleguin A, Azria D: Combined cetuximab and trastuzumab are superior to gemcitabine in the treatment of human pancreatic carcinoma xenografts. *Ann Oncol* 2010; 21(1): 98-103

-
88. **Leon O**, Panos C: Streptococcus pyogenes clinical isolates and lipoteichoic acid. *Infect Immun* 1990; 58(11): 3779-3787
 89. **Lee SC**, Srivastava RM, López-Albaitero A, Ferrone S, Ferris RL: Natural killer (NK):dendritic cell (DC) cross talk induced by therapeutic monoclonal antibody triggers tumor antigen-specific T cell immunity. *Immunol Res* 2011; 50(2-3): 248-254
 90. **Lièvre A**, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Côté JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P: KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006; 66(8): 3992-3995
 91. **Linnebacher M**, Maletzki C, Emmrich J, Kreikemeyer B: Lysates of S. pyogenes Serotype M49 induce pancreatic tumor growth delay by specific and unspecific antitumor immune response. *J Immunother* 2008; 31: 704-713
 92. **Linnebacher M**, Maletzki C, Ostwald C, Klier U, Krohn M, Klar E, Prall F: Cryopreservation of human colorectal carcinomas prior to xenografting. *BMC Cancer* 2010; 10: 362
 93. **Linnebacher M**, Maletzki C, Klier U, Klar E: Bacterial immunotherapy of gastrointestinal tumors. *Langenbecks Arch Surg* 2011; 397(4): 557-568
 94. **Löhr JM**, Heinemann V, Friess H et al. (2003): Ätiologie und Pathogenese. In: Löhr JM et al. (Hrsg.): Pankreaskarzinom Aktuelle Diagnostik und Therapie. UNI-MED Verlag, Bremen, 20-24, a
 95. **Löhr JM**, Heinemann V, Friess H et al. (2003): Epidemiologie. In: Löhr JM et al. (Hrsg.): Pankreaskarzinom Aktuelle Diagnostik und Therapie. UNI-MED Verlag, Bremen, 2003, 28, b
 96. **Löhr JM**, Heinemann V, Friess H et al. (2003): Tumorbilogie. In: Löhr JM et al. (Hrsg.): Pankreaskarzinom Aktuelle Diagnostik und Therapie. UNI-MED Verlag, Bremen, 47-51, c

-
97. **Löhr** JM, Heinemann V, Friess H et al. (2003): Klinik. In: Löhr JM et al. (Hrsg.): Pankreaskarzinom Aktuelle Diagnostik und Therapie. UNI-MED Verlag, Bremen, 60, d
 98. **Löhr** JM, Heinemann V, Friess H et al. (2003): Therapie. Chemotherapie des fortgeschrittenen und inoperablen Pankreaskarzinoms. In: Löhr JM et al. (Hrsg.): Pankreaskarzinom Aktuelle Diagnostik und Therapie. UNI-MED Verlag, Bremen, 120-121, e
 99. **Löhr** JM, Heinemann V, Friess H et al. (2003): Therapie. Biological Response Modifiers und Immune Response Modifiers. In: Löhr JM et al. (Hrsg.): Pankreaskarzinom Aktuelle Diagnostik und Therapie. UNI-MED Verlag, Bremen, 149-153, f
 100. **López-Albaitero** A, Ferris RL: Immune Activation by Epidermal Growth Factor Receptor–Specific Monoclonal Antibody Therapy for Head and Neck Cancer . *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 133(12): 1277-1281
 101. **Luo** Y, Knudson MJ: Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin-Induced Macrophage Cytotoxicity against Bladder Cancer Cells. *Clin Dev Immunol* 2010; 2010: 357591
 102. **Maletzki** C, Linnebacher M, Kreikemeyer B, Emmrich J: Pancreatic cancer regression by intratumoural injection of live Streptococcus pyogenes in a syngeneic mouse model. *Gut* 2008; 57: 483-491
 103. **Maletzki** C: Evaluierung und Etablierung eines aktiven, immuntherapeutischen Ansatzes mit *S. pyogenes* im experimentellen Pankreaskarzinommodell der Maus, Dissertation, 2009
 104. **Maletzki** C, Gock M, Klier U, Klar E, Linnebacher M: Bacteriolytic therapy of experimental pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010; 16(28): 3546-3552
 105. **Maletzki** C, Kreikemeyer B, Bodammer P, Emmrich J, Linnebacher M (2012): Bacterial Immunotherapy-Antitumoral Potential of the Streptococcal Toxin Streptolysin S-. In: Srivastava S (Hrsg.): Pancreatic Cancer - Clinical Management, InTech, verfügbar über: <http://www.intechopen.com/books/pancreatic-cancer-clinical-management/bacterial-immunotherapy>

-
106. **Mann M**, Sheng H, Shao J et al.: Targeting cyclooxygenase 2 and HER2/neu pathways inhibits colorectal carcinoma growth. *Gastroenterology* 2001; 120: 1713-1719
 107. **Marangos IP**, Buanes T, Røsok BI, Kazaryan AM, Rosseland AR, Grzyb K, Villanger O, Mathisen O, Gladhaug IP, Edwin B: Laparoscopic resection of exocrine carcinoma in central and distal pancreas results in a high rate of radical resections and long postoperative survival. *Surgery* 2012; 151(5): 717-723
 108. **Marmor MD**, Skaria KB, Yardeb Y: Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 58: 93-103
 109. **Martinelli E**, De Palma R, Orditura M, De Vita F, Ciardiello F: Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy. *Clinical and Experimental Immunology* 2009; 158: 1-9
 110. **Mellor JD**, Brown MP, Irving HR, Zalcberg JR, Dobrovic A: A critical review of the role of Fc gamma receptor polymorphism in the response to monoclonal antibodies in cancer. *Journal of Hematology & Oncology* 2013; 6: 1
 111. **Migheli F**, Migliore L: Epigenetics of colorectal cancer. *Clin Genet* 2012; 81(4): 312-318
 112. **Milleck J** (1984): Zur Immunogenität von Tumoren. In: Milleck J: Immunologische Abwehr und Krebs. Akademie-Verlag, Berlin, 9
 113. **Moore MJ**, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA, Campos D, Lim R, Ding K, Clark G, Voskoglou-Nomikos T, Ptasynski M, Parulekar W; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group: Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1960-1966
 114. **Mullapudi B**, Ding Y, Ding X, Grippo P (2010): Drug Evaluation in Pancreatic Cancer Culture Systems. In: Han H, Grippo P (Hrsg.): Drug Discovery in Pancreatic Cancer – Models and Techniques. Springer New York, 21, a

115. **Mullapudi** B, Ding Y, Ding X, Grippo P (2010): Drug Evaluation in Pancreatic Cancer Culture Systems. In: Han H, Grippo P (*Hrsg.*): Drug Discovery in Pancreatic Cancer – Models and Techniques. Springer New York, 5, b
116. **Müller** M und Mitarbeiter (2010): Chirurgie für Studium und Praxis. 10. Auflage, Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach, 154
117. **Niethammer** AG, Lubenau H, Mikus G, Knebel P, Hohmann N, Leowardi C, Beckhove P, Akhisaroglu M, Ge Y, Springer M, Grenacher L, Buchler MW, Koch M, Weitz J, Haefeli WE, Schmitz-Winnenthal FH: Double-blind, placebo-controlled first in human study to investigate an oral vaccine aimed to elicit an immune reaction against the VEGF-Receptor 2 in patients with stage IV and locally advanced pancreatic cancer. *BMC Cancer* 2012, 12: 361
118. **Niethammer** AG, Xiang R, Becker JC, Wodrich H, Pertl U, Karsten G, Eliceiri BP, Reisfeld RA: A DNA vaccine against VEGF receptor 2 prevents effective angiogenesis and inhibits tumor growth. *Nature Medicine* 2002, 8(12): 1369-1375
119. **Nobbs** AH, Lamont RJ, Jenkinson HF: Streptococcus adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev* 2009, 73(3): 407-450
120. **Orentas** RJ, Johnson B, Hodge J (2008): Cancer Vaccines: Progress and Promise. In: Orentas RJ, Hodge JW, Johnson BD (*Hrsg.*): Cancer Vaccines and Tumor Immunity. Wiley – Interscience, A John Wiley & Sons, Inc., Publication, Hoboken, New Jersey, 4
121. **Pagès** F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Galon J: Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 2654-2666
122. **Papadopoulos** N, Lindblom A: Molecular basis of HNPCC: mutations of MMR genes. *Hum Mutat* 1997; 10: 89-99
123. **Patyar** S, Joshi R, Prasad Byrav DS, Prakash A, Medhi B, Das BK: Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy. *Journal of Biomedical Science* 2010; 17: 21

-
124. **Pino** MS, Shrader M, Baker CH, Cognetti F, Xiong HQ, Abbruzzese JL, McConkey DJ: Transforming growth factor alpha expression drives constitutive epidermal growth factor receptor pathway activation and sensitivity to gefitinib (Iressa) in human pancreatic cancer cell lines. *Cancer Res.* 2006; 66(7): 3802-3801
125. **Pollak** B: Untersuchungen zum Wirkungsverhalten ausgewählter Bakterienspezies auf humane Kolonkarzinomzellen, Diplomarbeit, 2009
126. **Porena** M, Zingaro M Del, a Lazzeri M, Mearini L, Giannantoni A, Bini V, Costantini E: Bacillus Calmette-Guérin versus Gemcitabine for intravesical therapy in high-risk superficial bladder cancer: a randomised prospective study. *Urol Int* 2010; 84: 23-27
127. **Rasheed** ZA, Yang J, Wang Q, Kowalski J, Freed I, Murter C, Hong SM, Koorstra JB, Rajeshkumar NV, He X, Goggins M, Iacobuzio-Donahue C, Berman DM, Laheru D, Jimeno A, Hidalgo M, Maitra A, Matsui W: Prognostic significance of tumorigenic cells with mesenchymal features in pancreatic adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2010, 102: 340-351
128. **Rivalain** N, Roquain J, Demazeau G: Development of high hydrostatic pressure in biosciences: pressure effect on biological structures and potential applications in biotechnologies. *Biotechnol Adv* 2010, 28(6): 659-672
129. **Robert-Koch-Institut**: Krebs in Deutschland 2005-2006. Häufigkeiten und Trends. Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert-Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., 7. überarbeitete Auflage, 2010
130. **Roitt** IM, Brostoff J, Male DK (1995): Kurzes Lehrbuch der Immunologie. 3. neubearbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 224-225
131. **Sakaue-Sawano** A, Kobayashi T, Ohtawa K, Miyawaki A: Drug-induced cell cycle modulation leading to cell-cycle arrest, nuclear mis-segregation, or endoreplication. *BMC Cell Biol* 2011; 12: 2
132. **Scarpa** A, Moore PS, Rigaud G, Zamboni G (2000): Genetic Anomalies of Pancreatic Cancer. In Dervenis CG, Bassi C (Hrsg.): Pancreatic Tumors. Achievements and Prospective. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 37-44

-
133. **Schrager** HM, Alberti S, Cywes S, Dougherty GJ, Wessels MR: Hyaluronate acid capsule modulates M protein mediated adherence and acts as a ligand for attachment of group A streptococci to CD44 on human keratinocytes. *J Clin Invest* 1998; 101: 1708-1716
134. **Schutte** M, Hruban RH, Geradts J, Maynard R, Hilgers W, Rabindran SK, Moskaluk CA, Hahn SA, Schwarte Waldhoff I, Schmiegel W, Baylin SB, Kern SE, Herman JG: Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 1997; 57: 3126-3130
135. **Seki** T, Ohba N, Makino R, Funatomi H, Mitamura K: Mechanism of growth-inhibitory effect of cisplatin on human pancreatic cancer cells and status of p53 gene. *Anticancer Res* 2001, 21(3B): 1919-1924
136. **Seufferlein** T (2007): Prävention des kolorektalen Karzinoms. In: Bokemeyer C (Hrsg.): Das kolorektale Karzinom – Grundlagen, Prävention und moderne Therapiekonzepte. Socio-medico Verlag, Wessobrunn, 35-54
137. **Sierig** G, Cywes C, Wessels MR, Ashbaugh CD: Cytotoxic effects of streptolysin O and streptolysin S enhance the virulence of poorly encapsulated group A streptococci. *Infection and Immunity* 2003; 446-455
138. **Souders** NC, Verch T, Paterson Y (2008): Immunotherapeutic Strategies against Cancer using *Listeria monocytogenes* as a Vector for Tumor Antigens. In: Orentas RJ, Hodge JW, Johnson BD (Hrsg.): Cancer Vaccines and Tumor Immunity. Wiley – Interscience, A John Wiley & Sons, Inc., Publication, Hoboken, New Jersey, 114
139. **Staib** L, Link KH, Beger HG: Immunotherapy in pancreatic cancer – current status and future. *Langenbeck's Arch Surg* 1999; 384: 396-404
140. **Stier** S: Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Bakterienpräparationen auf das Wachstumsverhalten humaner Kolonkarzinomzellen. Bachelorarbeit, 2009
141. **Takaori** K, Hruban RH, Maitra A, Tanigawa N: Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. *Pancreas* 2004; 28: 257-262
142. **Tan** C, Du X: KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2012; 18(37): 5171-5180

-
143. **Tiemann** N, Hildebrandt G, Manda K: Unexpected effect of the monoclonal antibody Panitumumab on human cancer cells with different KRAS status. *Med Oncol*, 2011
 144. **Weiner** LM, Beldegrun AS, Crawford J, Tolcher AW, Lockbaum P, Arends RH, Navale L, Amado RG, Schwab G, Figlin RA: Dose and Schedule Study of Panitumumab Monotherapy in Patients with Advanced Solid Malignancies. *Clin Cancer Res* 2008; 14(2); 502-508
 145. **Wessels** MR, Bronze MS: Critical role of the group A streptococcal capsule in pharyngeal colonization and infection in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12238-12242
 146. **Xu** L, Hausmann M, Dietmaier W, Kellermeier S, Pesch T, Stieber-Gunckel M, Lippert E, Klebl F, Rogler G: Expression of growth factor receptors and targeting of EGFR in cholangiocarcinoma cell line. *BMC Cancer* 2010; 10: 302
 147. **Yang** WS, Park SO, Yoon AR: Suicide cancer gene therapy using pore-forming toxin, streptolysin O. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 1610-1619
 148. **Yayanos** AA, Pollard EC: A study of the effects of hydrostatic pressure on macromolecular synthesis in Escherichia coli. *Biophys J* 1969, 9(12): 1464-1482
 149. **Yazawa** K, Fujimori M, Nakamura T: Bifidobacterium longum as a delivery system for gene therapy of chemically induced rat mammary tumors. *Breast Cancer Res Treat* 2001; 66: 165-170
 150. **Yuk** JM, Shin DM, Song KS, Lim K, Kim KH, Lee SH, Kim JM, Lee JS, Paik TH, Kim JS, Jo EK: Bacillus calmette-guerin cell wall cytoskeleton enhances colon cancer radiosensitivity through autophagy. *Autophagy* 2010; 6(1): 46-60
 151. **Zamboni** G, Beghelli S, Lüttges J, Klöppel G (2000): Pancreatic Cancer Pathology. Guidelines for the Examination of Pancreatic Resection Specimens. In Dervenis CG, Bassi C (Hrsg.): Pancreatic Tumors. Achievements and Prospective. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 27-34

-
152. **Zitvogel** L, Apetoh L, Ghiringhelli F, André F, Tesniere A, Kroemer G: The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? *J Clin Invest* 2008; 118: 6: 1991-2001

A Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, 21.01.2014

.....

Tilly Ritz

B Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jörg Emmrich für die Überlassung des spannenden Themas. Leider konnte er mich bei meiner Dissertation auf Grund seines plötzlichen und unerwarteten Todes im Jahr 2011 nicht auf dem ganzen Weg begleiten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Michael Linnebacher, der wie selbstverständlich die weitere Betreuung meiner Dissertation übernahm. Ich danke ihm für die umfangreiche Beratung und wertvollen Hinweise beim Schreiben dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Jaster für seine besondere Unterstützung in einer ungewissen und schweren Zeit.

Mein herzlichster Dank gilt Frau Dr. Claudia Maletzki. Ohne ihre umfangreiche Einarbeitung in die Methodik und ihr jederzeit offenes Ohr für all meine Fragen wäre die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Ein weiterer Dank gilt ihr für die konstruktive Kritik sowie die vielen Ermutigungen, die die Fertigstellung einer solchen Arbeit bedürfen.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Kreikemeyer für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene. Auch Herrn Prof. Dr. Wolfram Mittelmeier und Herrn Dipl.-Ing. Tobias Lindner von der Orthopädischen Klinik und Poliklinik der Universität Rostock sei für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und die Unterstützung gedankt.

Ich möchte mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die angenehme und familiäre Atmosphäre bedanken. Es war eine wirklich schöne Zeit im Labor mit Euch, Claudia, Peggy, Willi und Gina.

Ich danke meinen Eltern, ohne Eure Unterstützung wäre ein Studium der Medizin und die Erstellung dieser Doktorarbeit nicht möglich gewesen.

Danke, lieber Christoph.

Thesen

1. Ethanol und Hochdruck können *S. pyogenes* inaktivieren, wobei eine antitumorale Wirksamkeit erhalten bleibt.
2. Avitale *S. pyogenes* können von Pankreas- und Kolonkarzinomzellen internalisiert werden. Die Kombination der Bakterien mit einem monoklonalen Antikörper hat darauf wenig Einfluss.
3. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen EGFR bzw. Her2/neu Überexpression und Therapieansprechen kann nicht aufgezeigt werden.
4. Der *KRAS*-Mutationsstatus stellt nicht den einzigen prädiktiven Marker für das Ansprechen auf eine Trastuzumab- bzw. Panitumumab-basierte Therapie dar.
5. Avitale *S. pyogenes*, Trastuzumab und Panitumumab (monoklonale Antikörper, mAk) und die Kombinationen aus Bakterien und mAk können den Anteil vitaler und metabolisch aktiver humaner Pankreas- und Kolonkarzinomzellen verringern.
6. Bei Kokultivierung mit immunkompetenten Zellen lässt sich ein antitumoraler Effekt der eingesetzten Therapeutika steigern. In der Regel zeigt eine längere Inkubationszeit stärkere Therapieeffekte.
7. Bei Kokultivierung mit immunkompetenten Zellen lässt sich bei Therapie mit mAk bei einem Teil der Zelllinien antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) nachweisen.
8. Apoptose kann als Zelltodmechanismus ausgeschlossen werden. Es zeigt sich kein erhöhter Anteil an Zellen mit SubG1-DNA Gehalt bei durchflusszytometrischer Apoptosebestimmung. Auch dem proapoptotischen Gen *BAX* kommt in diesem Zusammenhang keine wesentliche Bedeutung zu.